

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Biofilm-Bildung als Pathogenitätsmechanismus bei
persistierenden Infektionen und ihre mögliche Rolle bei der
Equinen Rezidivierenden Uveitis
eine Literaturstudie

von Pina Katharina Geißler
aus Starnberg

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ehemaliger Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie des Pferdes sowie für
Gerichtliche Tiermedizin

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Korreferent: Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Tag der Promotion: 06.02.2021

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	2
III.	ERGEBNISSE	3
1.	Hintergrund.....	3
1.1.	Geschichtliches	3
1.2.	Vorkommen	4
1.3.	Biofilm-assoziierte Infektionen	5
2.	Biofilm.....	6
2.1.	Biofilm-bildende Mikroorganismen	6
2.2.	Schritte in der Entstehung von Biofilm	7
2.3.	Zusammensetzung und Struktur des Biofilms	9
2.3.1.	Kohlenhydratreiche Polymere	10
2.3.2.	Proteine	12
2.3.3.	Extrazelluläre DNA	15
2.4.	Biofilm-assoziierte Infektionen	18
2.4.1.	Biofilm-assoziierte Infektionen in der Humanmedizin.....	19
2.4.1.1.	Mukoviszidose	19
2.4.1.2.	Wundinfektionen	21
2.4.1.3.	Parodontitis	24
2.4.2.	Biofilm-assoziierte Infektionen in der Veterinärmedizin	25
2.4.3.	Eigenschaften Biofilm-assoziiierter Infektionen	27
2.4.3.1.	Typische Merkmale	27
2.4.3.2.	Wechselwirkungen mit dem Immunsystem.....	28
2.4.3.3.	Wechselwirkungen mit Antibiotika	33
2.4.3.4.	Diagnostik und Therapie.....	43
3.	Leptospiren.....	52
3.1.	Taxonomie, Morphologie, Epidemiologie	52
3.2.	Leptospirose	53
3.3.	Leptospiren-Wirt-Wechselwirkungen	54
3.4.	Biofilm-Bildung	55

4.	Equine Rezidivierende Uveitis	58
4.1.	Definition und Vorkommen	58
4.2.	Einteilung, Symptome und Verlauf.....	59
4.3.	Ätiologie und Pathogenese	60
4.4.	Diagnose.....	63
4.5.	Therapie und Prognose	64
4.6.	Untersuchungen mit Glaskörper an ERU erkrankter Augen	66
IV.	DISKUSSION.....	70
1.	ERU als Biofilm-assoziierte Infektion.....	70
1.1.	Typische Merkmale Biofilm-assoziiierter Infektionen	70
1.2.	Parallelen im Krankheitsverlauf	73
1.3.	Parallelen in der Diagnostik.....	76
1.4.	Parallelen im Therapieansatz	78
2.	Biofilm-Bildung im Glaskörper	81
3.	Ausblick	84
V.	ZUSAMMENFASSUNG	86
VI.	SUMMARY	88
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	90
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
IX.	TABELLENVERZEICHNIS.....	133
X.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
XI.	DANKSAGUNG.....	136

I. EINLEITUNG

Bakterielle Biofilme haben in den letzten Jahren zunehmend an medizinischer Bedeutung gewonnen. Durch die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung können Mikroorganismen in unterschiedlichsten Umgebungen überleben und sich dabei an verschiedene Wachstumsbedingungen anpassen. Biofilme kommen sowohl in der Umwelt als auch *in vivo* vor, wenn sie im Zuge bakterieller Infektionen gebildet werden. Durch die Biofilm-Matrix geschützt sind Bakterien im Biofilm nur eingeschränkt durch das Immunsystem oder antibiotische Behandlungen zu eliminieren, sodass sich chronische und rezidivierende Infektionen bei Mensch und Tier entwickeln können. Viele chronische Infektionen sind bereits nachweislich auf die Bildung von Biofilm zurückzuführen.

Die Equine Rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine chronische Erkrankung des Pferdeauges, die durch eine Leptospiren-Infektion ausgelöst und durch wiederkehrende Entzündungsschübe gekennzeichnet ist. Obwohl bereits Hinweise auf eine Beteiligung von Biofilm bei der Pathogenese der ERU bestehen, ist diese noch nicht abschließend nachgewiesen. Um das bisherige Wissen über die bakterielle Biofilm-Bildung und ihre Beteiligung bei Biofilm-assoziierten Infektionen besser zu verstehen und für die weitere Erforschung der Pathogenese der ERU nutzen zu können, wurde die vorliegende Literaturstudie in Angriff genommen. Dabei sollte ein Grundstein für zukünftige Untersuchungen zur Pathogenese der ERU geschaffen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Themengebiet „Biofilm und Biofilm-assoziierte Infektionen“ anhand der bestehenden Literatur darzustellen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Mechanismen zur Persistenz von Biofilmbildenden Bakterien gelegt. Um die Bedeutung der Forschung über die mögliche Beteiligung von Biofilm in der Entstehung und im Verlauf der ERU weiter hervorzuheben, sollten Parallelen in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie zu Biofilm-assoziierten Infektionen ausgearbeitet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die Literaturrecherche fand fast ausschließlich über das Internet statt. Bei der Suche nach relevanten Artikeln wurden in erster Linie PubMed und ResearchGate genutzt, in Einzelfällen auch Google Scholar. Relevante Artikel wurden, sofern sie nicht als Volltext bei PubMed oder ResearchGate verfügbar waren, über die E-Medien der Universitätsbibliothek der LMU bezogen.

Das Themengebiet „Biofilm“ wurde anhand ausgewählter, repräsentativer Bakterienstämme erläutert. Die Forschung zum Thema Biofilm ist bei *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bereits weit fortgeschritten, sodass sich diese Bakterienstämme gut zur Beleuchtung der Thematik eigneten. Bei der Fülle an Literatur zum Thema Biofilm konnte so ein speziesübergreifender Überblick und gleichzeitig eine differenzierte Darstellung der Biofilm-Bildung einzelner Mikroorganismen geschaffen werden.

Ein ähnliches Prinzip wurde bei der Auswahl Biofilm-assoziiierter Infektionen verfolgt. Die *P.-aeruginosa*-Infektion bei Mukoviszidose-Patienten, Parodontitis und chronische Wundinfektionen stehen nachgewiesenermaßen mit der Biofilm-Bildung der ursächlichen Mikroorganismen in Zusammenhang. Die typischen Merkmale Biofilm-assoziiierter Infektionen konnten so anhand gut erforschter Beispiele erarbeitet werden.

Zur Darstellung der Persistenz-Mechanismen von Bakterien im Biofilm wurden Wechselwirkungen mit Antibiotika und dem Immunsystem gemäß dem aktuellen Forschungsstand erläutert. Die Equine Rezidivierende Uveitis wurde anhand bestehender Literatur beschrieben. Die Besonderheiten des Glaskörpers in Hinblick auf Anatomie und Physiologie sowie bekannte Veränderungen in Zusammenhang mit der ERU wurden vor dem Hintergrund einer möglichen Biofilm-Bildung beleuchtet.

III. ERGEBNISSE

1. Hintergrund

1.1. Geschichtliches

Die Entdeckung von mikrobiellem Biofilm reicht zurück bis ins 17. Jahrhundert. Mit der Entwicklung der ersten Lichtmikroskope erkannte Antoni van Leeuwenhoek erstmals sogenannte „Animalicules“ im Zahnbelag seiner eigenen Zähne. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Entdeckung wohl um den ersten dokumentierten Nachweis von mikrobiellem Biofilm handelte. Heute werden solche Biofilme als mikrobielle Gemeinschaften definiert, die an ein Substratum gebunden und von extrazellulärer polymerer Substanz (EPS) umgeben sind, die durch die Bakterien selbst produziert wurde (Percival *et al.*, 2011).

Heukelekian und Heller postulierten 1940 den sogenannten „*bottle effect*“ in marinen Mikroorganismen, demzufolge sich das Bakterien-Wachstum substantiell steigerte, wenn sie an einer Oberfläche hafteten (Heukelekian & Heller, 1940, Percival *et al.*, 2011). Umfangreiche physikalische und chemische Analysen begannen erst in den 1970er Jahren, als die Vorherrschaft von bakteriellem Biofilm erkannt wurde (Percival *et al.*, 2011). Costerton *et al.* verkündeten 1978, dass die Mehrheit von Bakterien in aquatischen Ökosystemen in Biofilmen und an Oberflächen haftend wachsen und sich diese festgewachsenen Bakterienzellen zutiefst von ihren freien planktonischen Gegenspielern unterscheiden (Costerton *et al.*, 1978, Donlan & Costerton, 2002).

Vier Jahre später beobachtete Costerton die Bildung eines Biofilms durch *S. aureus* auf einer Herzschrittmacherelektrode. Damit setzte er den Grundstein für die Erforschung von Biofilmen in der medizinischen Mikrobiologie (Marrie *et al.*, 1982).

Strukturelle, biophysikalische und chemische Untersuchungen – insbesondere der die Bakterien umgebenden „Glykokalix“ – führten 1995 zu dem grundlegenden Konzept eines „Biofilm-Modells“. In diesem Modell bilden Mikroorganismen Mikrokolonien, die von EPS umgeben und durch wassergefüllte Kanäle miteinander verbunden sind (Percival *et al.*, 2011).

Mittels genetischer Studien wurde kurze Zeit später dem Prozess der Anhaftung planktonischer Bakterienzellen und der dadurch ausgelösten Biofilm-Bildung auf den Grund gegangen. Es wurde bekannt, dass durch die initiale Zellbindung an Oberflächen spezifische Gene transkribiert werden, die die Produktion von bakteriellen Komponenten zur Adhäsion und Biofilm-Bildung aktivieren. Ferner wurde eine veränderte Wachstumsrate der Bakterien im Biofilm erkannt, sowie die Tatsache, dass diese Zellen des „Biofilm-Phänotyps“ im Vergleich zu planktonischen Bakterienzellen unterschiedliche Gene transkribieren (Donlan & Costerton, 2002).

1.2. Vorkommen

Biofilme kommen in der Natur ubiquitär in allen wässrigen Systemen vor. Dabei können sich die Bakterien an exotischste Lebensräume wie heiße Quellen, marine Sedimente, tiefe geologische Formationen und die Antarktis anpassen. Das Vorhandensein einer Grenzfläche, Wasser mit mikrobiell verwertbaren Nährstoffen und die Mikroorganismen selbst sind dabei die einzigen Voraussetzungen für die Entstehung von Biofilmen (Flemming & Wingender, 2001).

Durch Nährstoffanreicherung in der EPS-Matrix und deren gezielte Nutzung können sich verschiedene Bakterien im Biofilm zu synergistischen Gemeinschaften, sogenannten polymikrobiellen Biofilmen, zusammenschließen. Deren Fähigkeit, auch schwer abbaubare Substanzen umzusetzen, macht sie zu einem entscheidenden Bestandteil im Selbstreinigungsprozess von Böden, Sedimenten und Gewässern. In sogenannten *Batch-Biofilm*-Reaktoren wird sich diese Eigenschaft schon seit Jahrzehnten in der Abwasserreinigung zu Nutze gemacht (Kandeler *et al.*, 2000, Flemming & Wingender, 2001, Rodgers *et al.*, 2006).

Die ubiquitäre Besiedelung von Rohrleitungen in Trinkwassersystemen und Anlagen zur Wasseraufbereitung stellt hingegen eine große Problematik dar. *Biofouling* und Biokorrosion können daraus resultieren und dadurch nicht nur die Haltbarkeit der Rohrsysteme verkürzen, sondern auch die Trinkwasserqualität beeinträchtigen (Kubik, 2007).

Ein ähnliches Problem entsteht durch die Biofilm-Bildung in Wassersystemen medizinischer Geräte. Wasserschläuche in zahnärztlichen Behandlungseinheiten stellen ideale Voraussetzungen für eine bakterielle Anlagerung und Entstehung von

Biofilm dar: ein großes Oberflächen- / Volumen-Verhältnis, laminäre Strömung und Wasserstauung. Eine mikrobielle Kontamination des ausgegebenen Wassers ist die Folge und birgt ein Infektionsrisiko für Patienten und medizinisches Personal (Costa *et al.*, 2016).

Neben der Bedeutung von Biofilmen in umweltassoziierten Lebensräumen spielt die bakterielle Besiedelung von lebendem Gewebe eine ebenso bedeutende Rolle. Das menschliche Mikrobiom, bestehend aus etwa 1×10^{14} Mikroorganismen, setzt sich zum Großteil aus der Darmflora zusammen. Daneben sind aber auch die Mikroorganismen von Haut (Hautflora) und Schleimhäuten (u.a. Mund-, Rachen- und Nasenflora, Vaginalflora) mit einbezogen. Das intestinale Mikrobiom stellt ein Paradebeispiel für das nützliche Zusammenspiel von Bakterien und Wirt dar. Metabolische Funktionen wie die Aufspaltung von unverdaulichen Nahrungsbestandteilen, der Abbau von toxischen Bestandteilen und die Produktion von Vitaminen sind dabei für den Wirt essentiell. Außerdem gewinnt die Erforschung von Signalfunktionen des intestinalen Mikrobioms bei der Physiologie und Entwicklung des Wirts und der Regulation seines Immunsystems stetig an Relevanz (de Vos, 2015, Stangl, 2020).

1.3. Biofilm-assoziierte Infektionen

Besonders aus medizinischer Sicht hat die Bedeutung von Biofilmen in den letzten Jahrzehnten einen hohen Stellenwert erlangt. Immer mehr chronische und rezidivierende bakterielle Infektionen werden auf die Beteiligung von Biofilmen untersucht. Harnwegsinfektionen (z. B. durch *E. coli*), die Mittelohrentzündung des Kindes (z. B. durch *Haemophilus influenzae*), Katheter-assoziierte Infektionen (z. B. durch *S. aureus*) sowie die Bildung von Zahnbelag und das Auftreten von Gingivitis stellen nur einen Teil der Biofilm-assoziierten Infektionen dar. Neben diesen häufig auftretenden und meist ungefährlichen Erkrankungen sind auch Infektionen wie Endokarditiden und Implantatinfektionen durch *S. aureus* und die schweren Atemwegsinfektionen durch *P. aeruginosa* bei Mukoviszidose-Patienten auf die Bildung von bakteriellem Biofilm zurückzuführen (Lewis, 2001).

Laut den *Centers for Disease Control* in den USA sind Biofilme bei etwa 65 % aller bakteriellen Infektionen in der Humanmedizin beteiligt. Die *National Institutes of Health* schätzen diesen Wert sogar auf 80 % (Joo & Otto, 2012).

Da sich die Pathophysiologie der meisten Biofilm-assoziierten Infektionen des Menschen kaum von denen der Tiere unterscheidet, ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der Beteiligung von Biofilm an bakteriellen Infektionen in der Veterinärmedizin einen ähnlichen Stellenwert erreicht. So spielen Biofilm-assoziierte Infektionen unter anderem bei domestizierten Wiederkäuern eine große – auch wirtschaftliche – Rolle. Darunter fallen zum Beispiel chronische Mastitiden durch *S. aureus*, die Paratuberkulose durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, Leberabszesse durch *Fusobacterium necrophorum* und Pneumonien durch *Pasteurella multocida* (Abdullahi *et al.*, 2016).

2. Biofilm

Ein Biofilm ist eine sessile Gemeinschaft mikrobiellen Ursprungs, die durch Zellen charakterisiert ist, die irreversibel an ein Substrat, eine Grenzfläche oder an sich selbst gebunden sind. Die Zellen sind dabei in eine Matrix von EPS eingebettet. Sie weisen einen veränderten Phänotyp auf, der sich in seiner Wachstumsrate und Gentranskription von seinen planktonischen Gegenspielern unterscheidet (Donlan & Costerton, 2002).

2.1. Biofilm-bildende Mikroorganismen

Es wird davon ausgegangen, dass über 99,9 % der Bakterien die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung besitzen und in Biofilmen an Oberflächen leben. Diese Vorherrschaft von Biofilmen wurde in allen natürlichen Ökosystemen nachgewiesen (exklusive Tiefengrundwasser und Tiefsee-Ozeane) (Costerton *et al.*, 1995, Donlan & Costerton, 2002).

Bei der Untersuchung von medizinisch relevanten Biofilmen ist *P. aeruginosa* einer der besonders gut erforschten Bakterienstämme. *P. aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommendes, gramnegatives Stäbchenbakterium der Gattung *Pseudomonas*. Aufgrund seiner bedeutenden Rolle in verschiedenen Erkrankungen ist *P. aeruginosa* in den Fokus medizinischer Forschung gerückt. Seine Fähigkeit zur Biofilm-Bildung trägt unter anderem zur Entwicklung persistierender Infektionen bei Mukoviszidose-Patienten und chronischen Wundinfektionen bei (Mulcahy *et al.*, 2014).

Ein besonders im Kontext von Antibiotika-Resistenzen viel diskutierter Bakterienstamm ist *S. aureus*. *S. aureus* ist ein grampositives, kokkenförmiges

Bakterium, das als Kommensale Teil der mikrobiellen Hautflora ist (Byrd *et al.*, 2018). Neben akuten Infektionen wie Bakteriämien und Hautabszessen, die üblicherweise durch planktonische Zellen verursacht werden, werden chronische *S.-aureus*-Infektionen mit der Bildung von Biofilm in Zusammenhang gebracht. *S. aureus* haftet und persistiert auf wirtseigenem Gewebe und unterhält dadurch medizinisch relevante Erkrankungen wie Osteomyelitis, Endokarditis und chronische Wundinfektionen. Aufgrund der Bedeutung von *S. aureus* bei nosokomialen Infektionen herrscht ein breites Verständnis über Physiologie und Infektionspathologie (Lister & Horswill, 2014).

Auch *S. epidermidis* ist ein kommensaler Hautbewohner, der heutzutage als ein wichtiges opportunistisches Pathogen gilt. *S. epidermidis* stellt mit *S. aureus* die häufigste Ursache für nosokomiale Infektionen dar. Die Bildung von Biofilm ist vor allem bei medizinischen Produkten bedeutend, da diese bei Implantation häufig mit *S. epidermidis* kontaminiert sind. Obwohl *S.-epidermidis*-Infektionen nur selten lebensbedrohliche Erkrankungen auslösen, stellt ihre Therapie eine Herausforderung an das Gesundheitssystem dar. Resistenzen gegenüber Antibiotika und dem Immunsystem erhöhen die Widerstandsfähigkeit der Zellen im Biofilm und schränken die Möglichkeiten der Therapie maßgeblich ein (Otto, 2009).

2.2. Schritte in der Entstehung von Biofilm

Obwohl unterschiedlichste Mikroorganismen in Biofilmen zusammenleben, erfolgen die Schritte der Biofilm-Bildung stets nach einem gemeinsamen Muster: initialer Kontakt und Anhaftung an eine Oberfläche, Entstehung von Mikrokolonien, Reifung und Formation des Biofilmgerüsts und schließlich Abtrennung und Streuung von Teilen des Biofilms (siehe Abbildung 1).

Initialer Kontakt, Anhaftung an eine Oberfläche und / oder benachbarte Zellen

In dieser Phase binden mikrobielle Zellen unter Mitwirkung von physikalischen Kräften (Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen) mit ihren Pili, Fimbrien oder Geißeln an eine biotische oder abiotische Oberfläche. Sowohl Adhäsion (Bindung von Zellen an eine Oberfläche) als auch Kohäsion (Bindung von Zellen untereinander) kommen in diesem Stadium vor (Jamal *et al.*, 2018).

Während die Aggregation von Zellen in einem Biofilm ein elementares Merkmal darstellt, ist die Bindung an eine Oberfläche nicht zwingend notwendig. Bei

Mukoviszidose-Patienten beispielsweise sind *P.-aeruginosa*-Biofilme als Zellaggregate im Tracheobronchialsekret vorhanden – nicht jedoch an das Lungenepithel anhaftend (Bjarnsholt *et al.*, 2009, Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Entstehung von Mikrokolonien

Sobald die Bindung an eine Oberfläche stabil ist, beginnt die Phase der mikrobiellen Zellteilung, ausgelöst durch chemische Signalwege innerhalb der Exopolysaccharid-Matrix. Bakterielle Gemeinschaften in Biofilmen bestehen häufig aus vielen verschiedenen Mikrokolonien, die sich untereinander koordinieren. Dabei spielen Substrataustausch, Verteilung und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten eine wichtige Rolle. So kann in Biofilmen eine Umgebung geschaffen werden, in der Bakterien mit unterschiedlichem Metabolismus voneinander profitieren.

Reifung und Formation des Biofilmgerüsts

In dieser Phase spielt die Zell-zu-Zell-Kommunikation eine große Rolle. Durch Signalmoleküle, sogenannte Autoinduktoren, findet eine präzise Steuerung und Kontrolle der Zelldichte im Biofilm statt (*Quorum Sensing*). Außerdem werden Gene zur Produktion von EPS aktiviert, dem Hauptbestandteil der dreidimensionalen Biofilmstruktur. Interstitielle Hohlräume werden gebildet, die wassergefüllt sind und als Kreislaufsystem für den Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen den Mikrokolonien dienen.

Abtrennung und Streuung von Teilen des Biofilms

Um von der sessilen wieder in die motile Form überzugehen, kommt es in diesem Stadium im randständigen Biofilm zu einer schnellen Zellvermehrung. Saccharolytische Enzyme werden produziert, die das Verlassen der Zellen aus der EPS-Matrix erleichtern. So kommt es entweder spontan oder unter Einwirkung von mechanischem Stress zur Ablösung von Teilen des Biofilms. Außerdem wird die Proteinexpression zur Ausbildung von Geißeln gesteigert, womit die Bakterien sich zu einem neuen Ort der Anlagerung bewegen können (Jamal *et al.*, 2018).

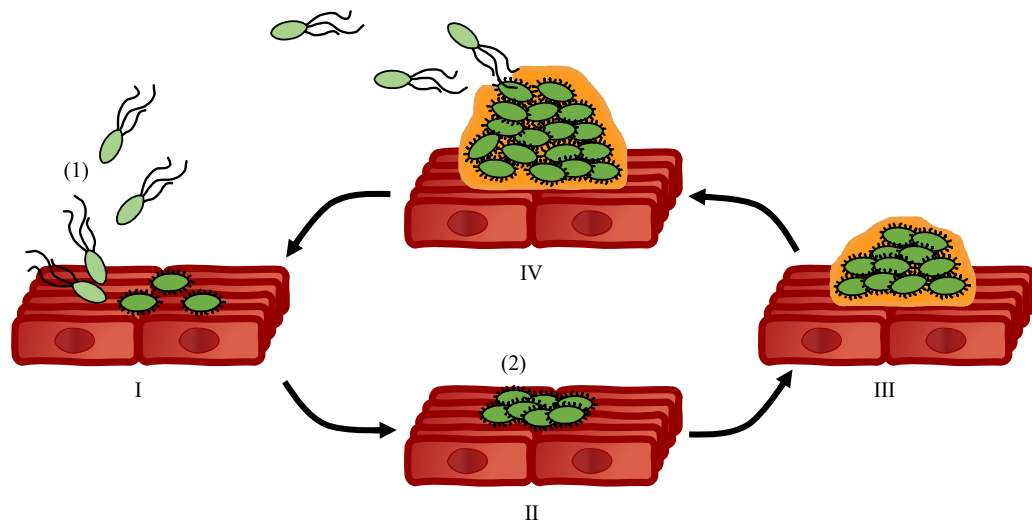


Abbildung 1: Schritte der Biofilm-Bildung

I. Nach initialem Kontakt und Anhaftung an die Substratoberfläche gehen planktonische Bakterien (1) in den Biofilm-Phänotyp (2) über. II. Es kommt zur Bindung der Zellen untereinander und zur Entstehung von Mikrokolonien. III. Daraufhin werden Bestandteile der Biofilm-Matrix synthetisiert und das Biofilmgerüst aufgebaut. IV. Die Streuung von Teilen des Biofilms und Freisetzung von Bakterien stellt den letzten Schritt der Biofilm-Bildung dar. Freigesetzte Bakterien gehen in den planktonischen Phänotyp über, um sich an einen neuen Ort der Anlagerung zu bewegen.

2.3. Zusammensetzung und Struktur des Biofilms

Obwohl EPS in allen Biofilmen vorkommt, existieren doch erhebliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung und im Zeitpunkt ihrer Synthese. So können Biofilme von unterschiedlichen Bakterienspezies und sogar Biofilme verschiedener Stämme einer Spezies einer großen Variabilität unterliegen. Veränderungen der Umgebungsbedingungen während der Biofilm-Bildung wirken sich ebenfalls auf die Biofilm-Architektur aus (Branda *et al.*, 2005).

Bis zu 97 % der Biofilm-Matrix besteht aus Wasser, das zum einen in der Matrix gebunden vorliegt und sich zum anderen als Transportmedium für Nährstoffe, Enzyme und Stoffwechselprodukte in interstitiellen Hohlräumen befindet. Lediglich 2-5 % des Biofilms bestehen aus mikrobiellen Zellen. Extrazelluläre Polysaccharide und Proteine stellen die Schlüsselkomponenten der extrazellulären Matrix dar und machen dabei zusammen einen Anteil von 2-4 % aus. Dazu kommen extrazelluläre DNA, RNA und Zelldetritus (< 1-2 %) (Sutherland, 2001).

Neben mikrobiell synthetisierten Matrix-Bestandteilen werden bei klinisch relevanten Biofilmen auch Komponenten des Immunsystems und der Biofilm-Umgebung in die Matrix aufgenommen. So werden bei dentalen Biofilmen Proteine

aus dem Speichel gebunden und bei infektiösen Endokarditiden Blutbestandteile wie Fibrin und Thrombozytenaggregate in den Biofilm integriert (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). An Orten chronischer Entzündung mit einströmenden *Polymorphonuclear Leucocytes* (Neutrophile Granulozyten, PMNs) kann außerdem DNA, die von lysierten PMNs stammt, als Bestandteil der Biofilm-Matrix genutzt werden (Jakubovics *et al.*, 2013).

2.3.1. Kohlenhydratreiche Polymere

Extrazelluläre Polysaccharide spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Biofilm-Architektur (Branda *et al.*, 2005). Ihre Fähigkeit, große Mengen Wasser zu binden, schützt Bakterien im Biofilm effektiv vor Austrocknung und gleicht Feuchtigkeitsschwankungen in der Umgebung aus. Mutierte Bakterienstämme, die die Fähigkeit zur EPS-Synthese verloren haben, sind nicht mehr in der Lage, stabile Biofilme zu bilden – auch wenn die Anlagerung an Oberflächen und die Bildung von Mikrokolonien weiterhin beobachtet werden kann (Sutherland, 2001).

Je nach Bakterienstamm werden verschiedene Typen von Polysacchariden produziert, die jeweils auch starke Auswirkungen auf die Virulenz des Erregers haben können (Branda *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa

Bei der Erforschung von *P.-aeruginosa*-Biofilmen ging man viele Jahre davon aus, dass das Polysaccharid Alginat den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ausmacht. Grundlage für diese Annahme war das häufige Verwenden von mukoiden Stämmen aus Mukoviszidose-Patienten, deren Überproduktion von Alginat maßgeblich für die Mukoidität und den Krankheitsverlauf bei Mukoviszidose verantwortlich ist (Deretic *et al.*, 1990). Nicht-mukoide Stämme von *P. aeruginosa*, die ebenfalls Biofilm bildeten, wiesen dagegen wenig bis kein Alginat in der EPS auf. Stattdessen wurden die Polymere Pel und Psl nachgewiesen, die ebenfalls bedeutend an der Biofilmstruktur beteiligt sind (Wozniak *et al.*, 2003).

Die Überproduktion des kapsulären Polysaccharids Alginat führt zu morphologischen Veränderungen im Biofilm, die für eine erhöhte Antibiotika-Resistenz und eine erhöhte Resistenz gegenüber Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems verantwortlich sind (Ryder *et al.*, 2007).

Psl, ein mannose- und galaktosereiches Polysaccharid, das bei Studien mit dem nicht-mukoiden *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 entdeckt wurde, wird für Wechselwirkungen zwischen Zellen und Oberflächen und zwischen Zellen untereinander benötigt. Auch für die Erhaltung der Struktur des Biofilms nach Anhaftung ist Psl eine wichtige Komponente. So wird davon ausgegangen, dass Psl als Gerüst dient, das Zellen im Biofilm in der Matrix zusammenhält (Ma *et al.*, 2006).

Für die Biofilm-Bildung an Grenzflächen zwischen Flüssigkeit und Luft (sog. Pellikel) benötigt *P. aeruginosa* ein weiteres Polysaccharid: das glukosereiche Polysaccharid Pel. Studien mit mutierten PA14 Stämmen ohne die Fähigkeit zur Pel Produktion ergaben, dass zwar die Initiation der Biofilm-Bildung gleich blieb, die Morphologie der Kolonien sich aber veränderte (Ryder *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis

Ein wichtiges Polysaccharid in Biofilmen von *S. epidermidis* und *S. aureus* ist das *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA), auch Poly-N-Acetylglucosamin (PNAG) genannt. PIA wird bei Aktivierung des *ica*-Operons synthetisiert, dient als Adhäsion und wird für die Anhaftung an Oberflächen benötigt (Branda *et al.*, 2005). Das Vorhandensein von PIA ist entscheidend für die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung und dadurch für die Virulenz des Erregers verantwortlich: bei Versuchen an Mäusemodellen mit einem *S. epidermidis*-Wildtyp und mutiertem *S. epidermidis* (ohne die Fähigkeit, PIA zu synthetisieren) konnten signifikante Unterschiede in der Virulenz des Erregers nachgewiesen werden. So traten ohne die Produktion von PIA nur 14 % statt 71 % Implantat-assoziierte Infektionen bei zentralen Venenverweilkathetern auf. Ähnliches konnte bei Versuchen mit *Staphylococcus carnosus* (*S. carnosus*) Stämmen beobachtet werden: Klone von nicht-Biofilm-bildenden *S. carnosus*-Stämmen waren nach dem Transfer von *intercellular-adhesion*-Genen zur Produktion von PIA und damit zur Biofilm-Bildung fähig (Gotz, 2002).

PIA-ähnliche Polysaccharide wurden auch bei gramnegativen Bakterienspezies wie *E. coli* gefunden. Die Bedeutung für die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung konnte hier ebenfalls nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2004).

Des Weiteren spielen Teichonsäuren eine große Rolle in der Biofilm-Bildung von Staphylokokken. Als Hauptbestandteil der Zelloberfläche grampositiver Bakterien

interagieren sie mit anderen Oberflächenpolymeren und dienen als Gerüst für die Anhaftung von Proteinen (Sadovskaya *et al.*, 2005).

2.3.2. Proteine

Zu den proteinartigen Bestandteilen der Biofilm-Matrix zählen Oberflächenadhäsine, Proteinuntereinheiten von Flagellen und Fimbrien, sezernierte extrazelluläre Proteine sowie Proteine in Außenmembranvesikeln. Zelloberflächenproteine, Flagellen und Fimbrien tragen zur initialen Anlagerung an Oberflächen bei und ermöglichen damit die Kolonisation von Oberflächen. Proteine mit enzymatischen Fähigkeiten sind in der Lage, andere Matrixkomponenten zu spalten und damit die Biofilmstruktur zu verändern. So kann es zur Reorganisation des Biofilms oder zum Matrixabbau und zur Biofilmstreuung kommen (Fong & Yildiz, 2015).

Pseudomonas aeruginosa

Bislang sind drei biofilmrelevante Matrixproteine bei *P.-aeruginosa*-Stämmen bekannt: die Lektine LecA und LecB sowie das Psl-bindende Matrixprotein CdrA (*Cyclic diguanylate-regulated two-partner secretion partner A*) (Fong & Yildiz, 2015).

LecA wird für die Biofilm-Bildung auf Polystyrol- und Edelstahloberflächen benötigt. Durch Studien mit *lecA*-mutierten Stämmen, deren Oberflächenanlagerung reduziert war und LecA-überproduzierenden Stämmen mit gesteigerter Biofilm-Bildung konnte diese These bestätigt werden (Diggle *et al.*, 2006).

LecB ist an der Biofilm-Bildung an Glasoberflächen beteiligt. Ein *lecB*-mutierter Stamm formierte einen dünneren Biofilm mit reduzierter Oberflächenabdeckung im Vergleich zum Wildtyp (Tielker *et al.*, 2005).

CdrA ist zusammen mit CdrB Teil eines *two-partner-secretion*-Systems: CdrA wird bei Aktivierung des *cdrAB*-Operons über die äußere Membranpore CdrB durch die Zelloberfläche geschleust. CdrA bindet im Biofilm üblicherweise an das Polysaccharid Psl, fördert dadurch den Zusammenhalt im Biofilm und schützt sich vor der Spaltung durch Proteasen in entzündlichem Gewebe. Doch auch bei Abwesenheit von Psl und anderen EPS kann der Zellzusammenhalt im Biofilm durch CdrA-CdrA-Bindungen aufrechterhalten werden – eine nützliche

Anpassungsmöglichkeit an sich verändernde Umweltbedingungen. CdrA-defiziente Bakterienstämme sind zwar zur Biofilm-Bildung in der Lage, dieser entspricht dann jedoch lockeren Ansammlungen von Bakterienzellen mit mäßiger Integrität (Reichhardt *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis

Staphylokokken können sowohl auf abiotischen als auch auf biotischen Oberflächen Biofilme bilden. Je nach Art der Oberfläche werden unterschiedliche Proteine für die erste Anlagerung benötigt. Die Anlagerung an Plastik- oder Metalloberflächen von beispielsweise medizinischen Implantaten erfolgt über das Aap-Protein (*accumulation-associated protein*, *S. epidermidis*) (siehe Abbildung 2) bzw. das SasG-Protein (*S. aureus surface protein G*), während die Anlagerung an lebendem Gewebe oder an Oberflächen mit Plasmakomponenten (Fibronektin, Fibrinogen, Vitronektin) durch sogenannte CWA-Proteine (*cell wall anchored*) mediiert wird. Zu der Familie der CWA-Proteine gehören MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) (siehe Abbildung 2), NEAT (*near iron transporter*) -Proteine zur Hämbindung in eisenlimitierter Umgebung, das SraP (*serine-rich adhesin for platelets*) -Protein zur Bindung an Thrombozyten und das *S. aureus*-spezifische Protein A. Welche dieser Proteine auf der Bakterienoberfläche exprimiert werden, ist für jeden Stamm verschieden und wird auch durch Umgebungsbedingungen beeinflusst. *S. aureus* ist in der Lage, bis zu 24 verschiedene CWA-Proteine zu exprimieren (Speziale *et al.*, 2014).

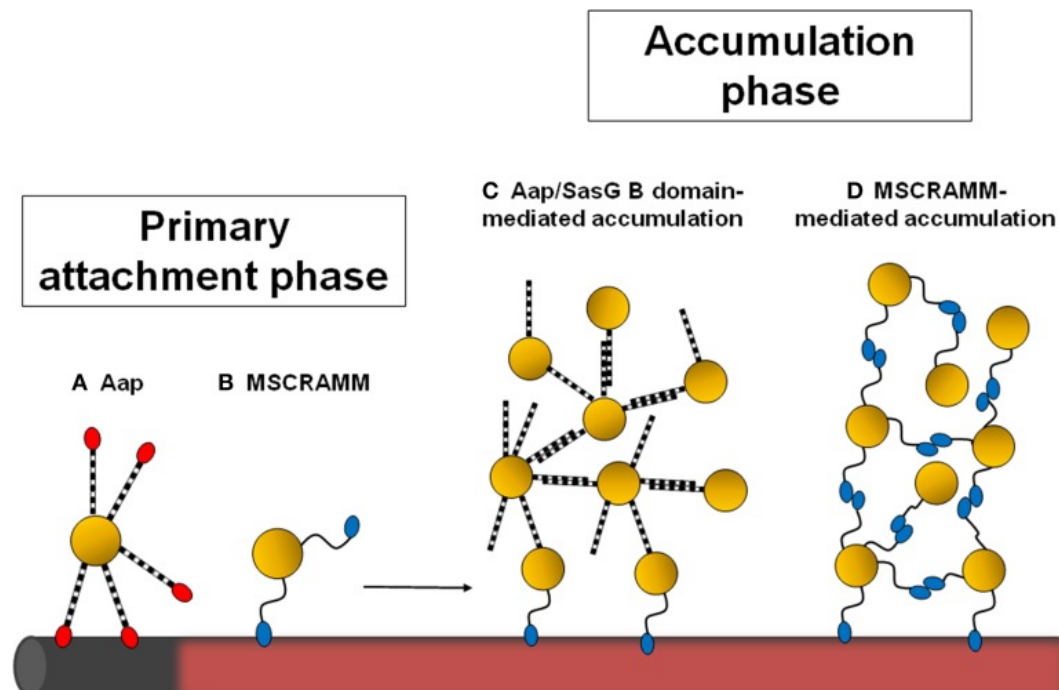


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biofilm-Bildung von Staphylokokken, mediiert durch CWA-Proteine

Staphylokokken können an Fremdoberflächen (grau) und Oberflächen mit angelagerten Plasmakomponenten (pink) binden. Die Aap-A-Domäne (rot) vermittelt die Bindung an Fremdoberflächen (A). Die Bindung an Oberflächen mit angelagerten Plasmakomponenten wird durch MSCRAMMs vermittelt (B). Die interzelluläre Akkumulation wird durch die Aap/SasG-B-Domäne gefördert (C). Alternativ können Wechselwirkungen zwischen MSCRAMMs die interzelluläre Akkumulation vermitteln (D) (Speziale *et al.*, 2014).

Welche Proteine für die Biofilm-Bildung von Staphylokokken essentiell sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Bei einigen CWA-Proteinen ist die Rolle in der Biofilm-Bildung jedoch bereits bekannt:

- Aap und SasG fördern sowohl die erste Anhaftung von Zellen an eine Oberfläche als auch die Akkumulationsphase in der Biofilm-Bildung (siehe Abbildung 2). Im Rattenmodell war die Besiedelung von implantierten Kathetern durch Aap-defiziente Mutanten von *S. epidermidis* im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Speziale *et al.*, 2014, Schaeffer *et al.*, 2015). Insbesondere bei PIA-negativen *S.-epidermidis*-Stämmen wird die interzelluläre Verbindung durch Aap-Fibrillen auf der Zelloberfläche gewährleistet, sodass auch ohne PIA die Bildung von Biofilm möglich ist (Rohde *et al.*, 2005).
- FnBPs (*fibronektin binding proteins*), SdrC (*Serine-aspartate repeat-containing protein C*) und ClfB (*Clumping factor B*), alle drei Teil der MSCRAMM-Gruppe, fördern die Biofilm-Akkumulation. Die

Genexpression von ClfB und FnBPA ist während des Biofilm-Wachstums gesteigert (Resch *et al.*, 2005). Bei *in-vivo*-Versuchen mit FcBP (*Fc-binding protein*) -defizienten Mutanten war eine Besiedelung von implantierten Kathetern deutlich vermindert (Vergara-Irigaray *et al.*, 2009).

- Bap (*biofilm-associated protein*) von *S. aureus* fördert die Biofilm-Bildung bei Staphylokokken-Stämmen, die aus Milchdrüsen von Wiederkäuern mit Mastitis isoliert wurden (Cucarella *et al.*, 2001).
- Die Überproduktion von Protein A durch *S. aureus* ist für bakterielle Anlagerung und Biofilm-Bildung verantwortlich. Diese durch Protein A mediierte Biofilm-Bildung konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen Protein A verhindert werden (Merino *et al.*, 2009).

2.3.3. Extrazelluläre DNA

Extrazelluläre DNA (eDNA) in der Biofilm-Matrix hat in den letzten Jahren – vor allem in Bezug auf mögliche Therapieansätze von Biofilm-assoziierten Infektionen – einen hohen Stellenwert erlangt. So fanden Whitchurch *et al.* 2002 heraus, dass durch Zugabe von DNase I die Bildung von Biofilm bei *P. aeruginosa* gehemmt sowie „junger“, schon bestehender Biofilm zerstört werden konnte (Whitchurch *et al.*, 2002).

eDNA in der Biofilm-Matrix kann sowohl exogenen als auch endogenen Ursprungs sein. Exogene eDNA wird durch lysierte PMNs an Infektionsherden freigesetzt und in die Biofilm-Matrix aufgenommen, während endogene eDNA von den Bakterienzellen selbst stammt (Jakubovics *et al.*, 2013).

Endogene eDNA wird durch Zelllyse entlassen, die in Bakterienpopulationen entweder durch *Quorum Sensing* (QS) oder durch QS-unabhängige Mechanismen gesteuert wird, sodass ein Teil der Bakterienzellen während der exponentiellen Wachstumsphase und der frühen stationären Phase abstirbt.

QS-unabhängige Mechanismen sorgen bei *P. aeruginosa* für ein basales Level an eDNA-Freisetzung (z. B. Prophagen-induziert), QS-abhängige Mechanismen führen zeitweise zu vermehrter Zelllyse und dadurch erhöhter eDNA-Freisetzung. Die QS-Moleküle Acylierte Homoserin-Laktone (AHLs) und das *Pseudomonas* *Quinolone Signal* (PQS) kontrollieren dabei die Produktion von Zelllyse-Faktoren wie Prophagen und Phenazin.

Grampositive Bakterien steuern ihre eDNA-Freisetzung durch Autolysine, die im Zuge von QS ausgeschüttet werden (Das *et al.*, 2013). Das Autolysin AtlE von *S. epidermidis* induziert dabei die Lyse eines Teils der Bakterienpopulation, wodurch eDNA ausgeschüttet und die überlebende Population zur Anhaftung an Oberflächen und Biofilm-Bildung angeregt wird. Wie Qin und Mitarbeiter herausfanden, scheint eDNA dabei vornehmlich an der initialen Anhaftung und der Zell-Zell-Verbindung während der Akkumulationsphase beteiligt zu sein. Ausgereifte Biofilme konnten durch die Zugabe von DNase I nicht mehr beeinflusst werden (Qin *et al.*, 2007).

Bei *S. aureus* wird die Zelllyse durch *cid*- und *lrg*-Operone kontrolliert, deren Produkte als Holine und Antiholine fungieren und so – analog zu Bakteriophagen-medierter Zelllyse – den programmierten Zelltod in einer Population regulieren. *cidA*-Aktivierung führt dabei zu einer erhöhten Zelllyse und dem Freisetzen von eDNA während der Entstehung von Biofilm, während *lrgA*-Aktivierung dieser entgegenwirkt. Sowohl Mutationen im *cidA*- als auch im *lrgA*-Operon führen zu veränderter Biofilm-Reifung. Demnach ist eine ausgewogene Expression dieser Gene für die Entwicklung von *S.-aureus*-Biofilmen entscheidend (Mann *et al.*, 2009).

Während der ersten Phase der Anhaftung von Bakterienzellen an Oberflächen spielen Lifshitz-Van-der-Waals-Kräfte (anziehend) und Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zelloberfläche und der größtenteils negativ geladenen Substratoberfläche (abstoßend) die entscheidende Rolle. In der zweiten Phase werden spezifischere Interaktionen ausgebildet, wie beispielsweise durch Ligand- und Rezeptormoleküle oder produzierte Polymere, wodurch die Kraft der Anhaftung mit der Zeit steigt (Okshevsky & Meyer, 2015). eDNA bildet auf der Zelloberfläche schleifenartige Strukturen, die weit genug über die Oberfläche hinausragen, um die sich abstoßenden Kräfte in der ersten Phase zu überbrücken (siehe Abbildung 3). Während der zweiten Phase werden stabile Bindungen zwischen sauren Elektronenakzeptor-Regionen und basischen Elektronendonator-Regionen gebildet (Das *et al.*, 2011).

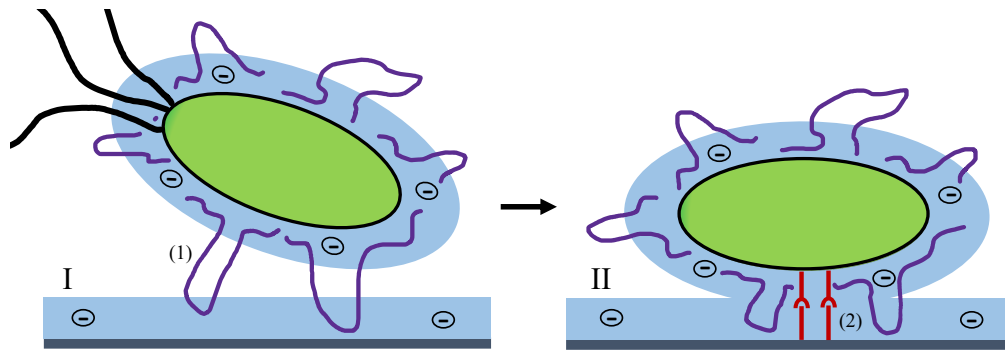


Abbildung 3: eDNA-vermittelte Anhaftung an eine Oberfläche

I. eDNA bildet auf der Zelloberfläche schleifenartige Strukturen (1), die während der ersten Phase der Anhaftung den Abstand zwischen den negativ geladenen Oberflächen überbrücken. II. Während der zweiten Phase kommt es zu stabilen Bindungen zwischen Zelloberfläche und Substrat (2). Dabei können z. B. Rezeptor-Ligand-Bindungen oder Elektronendonator- und Elektronenakzeptor-Bindungen ausgebildet werden.

Der Virulenzfaktor Beta-Toxin von *S. aureus* ist eine neutrale Sphingomyelinase, die in Anwesenheit von eDNA in *S.-aureus*-Populationen Oligomere bildet und mit einer ausgeprägten Biofilm-Bildung einhergeht. Die miteinander vernetzten Beta-Toxin-Moleküle bilden dabei das skelettartige Gerüst des entstehenden Biofilms. *In vitro* Versuche mit *S.-aureus*-Stämmen zeigten, dass durch das Abschalten des für die Produktion von Beta-Toxin verantwortlichen Gens *hly* die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung deutlich gestört wurde. Im Vergleich zu den dicht gepackten Zellkonglomeraten bei *hly*⁺-Stämmen zeigten *hly*⁻-Stämme lediglich kleine Gruppen zerstreuter Kolonien. Huseby *et al.* nannten diese eDNA-abhängige Oligomerisation von Beta-Toxin „Biofilm-Ligase-Aktivität“ (Huseby *et al.*, 2010).

Ein weiteres eDNA-bindendes Protein ist der *Integration Host Factor* (IHF) von zahlreichen gramnegativen Bakterien (unter anderem *P. aeruginosa*). Dieser trägt zur Vernetzung von eDNA-Molekülen und damit zur Etablierung einer stabilen Biofilm-Matrix bei. Biofilme von *Haemophilus influenzae* und *Burkholderia cenocepacia* konnten durch anti-IHF-Serum teilweise aufgelöst werden. Hierdurch wurde eine Alternative zur Behandlung mit DNase I geschaffen, die im Gegensatz zu DNase I auch ausgereifte Biofilme beeinflusste. Goodman *et al.* zeigten, dass die Immunisierung gegen IHF *in vivo* Biofilm-assoziierte Infektionen in Tierversuchen auflösen konnte (Goodman *et al.*, 2011, Okshevsky *et al.*, 2015).

Bakterien im Biofilm sind im Vergleich zu ihrer planktonischen Lebensform deutlich schlechter durch Antibiotika angreifbar (Costerton *et al.*, 1999). eDNA kann durch ihre negative Ladung kationische Antibiotika (z. B. Aminoglykoside)

binden und die Bakterienzellen durch diese Chelatbindung schützen (Chiang *et al.*, 2013).

Ein weiterer Mechanismus, der zur Resistenz gegenüber Antibiotika in Biofilmen beiträgt, ist der *Horizontal Gene Transfer* (HGT). Ausgeschüttete eDNA ist Teil eines dynamischen Genpools, durch den Mutationen in der Virulenz und Gene zur Antibiotikaresistenz in der Population verbreitet werden können. Durch die Fähigkeit zur Aufnahme exogener DNA, sog. „*Competence*“, wird eDNA in die genomische DNA aufgenommen und vermehrt (Montanaro *et al.*, 2011). Biofilme bieten mit ihrer hohen Zelldichte und der Akkumulation von eDNA die idealen Bedingungen für HGT (Nagler *et al.*, 2018).

2.4. Biofilm-assoziierte Infektionen

Biofilm-assoziierte Infektionen stellen durch ihre Persistenz und eingeschränkte Therapierbarkeit eine besondere Herausforderung an die Medizin dar. Sie sind daher in den letzten Jahrzehnten in den Fokus medizinischer Forschung gerückt. Der Großteil der bakteriellen Infektionen werden mit Biofilm-Bildung in Zusammenhang gebracht – laut den *National Institutes of Health* betrifft das 80 % der bakteriellen Infektionen in der Humanmedizin (Joo & Otto, 2012). Durch das Leben im Biofilm sind Bakterien sowohl vor antibiotischer Behandlung als auch vor der Abwehr durch das Immunsystem geschützt (Costerton *et al.*, 1999).

Klinische Biofilm-assoziierte Infektionen sind auch in ihrer Diagnostik anspruchsvoller als akute, nicht-Biofilm-assoziierte Infektionen. Häufig sind die Infektionserreger nicht bekannt und deren Kultivierung erweist sich als problematisch. Außerdem müssen pathologisch signifikante Biofilm-assoziierte Infektionen von mikrobieller Kolonisation durch nicht-pathogene Mikroorganismen unterschieden werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Biofilme verursachen typischerweise chronische Infektionen, die trotz scheinbar adäquater Antibiotika-Therapie und Abwehrmechanismen des Immunsystems persistieren. Sie werden durch eine persistente und progressive Pathologie charakterisiert, die vor allem durch die Entzündungsreaktion in der Umgebung des Biofilms unterhalten wird. Die persistierende lokale Entzündung ist das einzige gemeinsame Merkmal von verschiedensten Biofilm-assoziierten Infektionen, während weitere Symptome von der jeweiligen Lokalisation und Organfunktion abhängen (Hoiby *et al.*, 2010, Hoiby *et al.*, 2015).

Im Folgenden werden drei klassische Biofilm-assoziierte Infektionen der Humanmedizin beschrieben: Mukoviszidose, chronische Wundinfektionen und Parodontitis. Anschließend werden typische Merkmale Biofilm-assoziiierter Infektionen analysiert, insbesondere in Bezug auf Mechanismen zur Antibiotika-Resistenz und auf Wechselwirkungen mit dem Immunsystem.

2.4.1. Biofilm-assoziierte Infektionen in der Humanmedizin

2.4.1.1. Mukoviszidose

Mukoviszidose (engl. *Cystic Fibrosis*, CF) ist die häufigste letale Erbkrankheit der europäischen Bevölkerung (Koch, 2002). Sie ist eine monogene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mehrerer Organsysteme mit einer weltweiten Inzidenz von 1:32.000 bis 1:2.000. Der der Mukoviszidose zugrunde liegende Gendefekt betrifft das *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) -Gen (Gibson *et al.*, 2003). Durch den CFTR-Defekt kommt es zu einer Abnahme der epithelialen Chlorid-Sekretion und zu einer Zunahme der Natrium-Absorption. In der Lunge führt das zur Produktion von dehydriertem, zähem Schleim, der nur sehr schwer aus den Atemwegen zu entfernen ist (Donaldson & Boucher, 2003). Die mukoziliäre *Clearance* ist gestört, sodass entzündliche Abwehrmechanismen aktiviert werden. Klinische Symptome werden ausgelöst und chronische, rezidivierende bakterielle Lungenentzündungen entstehen (Gibson *et al.*, 2003).

CF-Infektionen können in zwei Stadien unterteilt werden, die sich klinisch unterscheiden. Im ersten Stadium entwickeln Patienten intermittierende Atemwegserkrankungen, die einer Bronchitis ähneln. Häufig sind Infektionen mit *S. aureus*, *H. influenzae* und *P. aeruginosa* daran beteiligt (Rajan & Saiman, 2002). Zwischen diesen Infektionen sind die Atemwege frei von mikrobieller Besiedelung und der Patient frei von respiratorischen Symptomen. Im zweiten Stadium leidet der Patient unter einer permanenten Infektion mit *P. aeruginosa*, die zu Beginn den vorangegangenen Entzündungsschüben ähnelt, durch das Immunsystem und antibiotische Behandlung jedoch nicht eliminiert werden kann (Pedersen, 1992). Stattdessen führt die chronische Entzündung mit der Zeit zu irreversibler Schädigung des Lungengewebes und Abnahme der Lungenfunktion, die schließlich im Lungenversagen endet (Bjarnsholt *et al.*, 2009).

Der Übergang zur permanenten Infektion wird mit dem Auftreten des mukoiden Phänotyps von *P. aeruginosa* in Zusammenhang gebracht (Pedersen, 1992). Hohe Level an oxidativem Stress, der durch Aktivierung einströmender PMNs aufrechterhalten wird, führen zu dieser spezifischen Mutation in der Lunge von CF-Patienten (Mathee *et al.*, 1999).

Sowohl nicht-mukoide als auch mukoiden Stämme von *P. aeruginosa* sind in der Lage, Biofilme zu bilden. Mukoide Stämme zeigen dabei jedoch eine Überproduktion des Matrix-Bestandteils Alginat, woraufhin der Biofilm stabiler und widerstandsfähiger gegenüber Antibiotika und dem Immunsystem ist (Hentzer *et al.*, 2001). Alginat stimuliert als potentes Antigen eine massive IgG- und IgA-Antikörperproduktion, die eine Immunkomplex-mediierte Entzündung des umliegenden Gewebes auslöst und das Lungengewebe nachhaltig schädigt (Bjarnsholt *et al.*, 2009).

P.-aeruginosa-Biofilme bilden sich vorwiegend in Form von Zellaggregaten innerhalb des Mukus. Dabei haften sie nicht am Oberflächenepithel an (Worlitzsch *et al.*, 2002). Durch Computertomographie konnte gezeigt werden, dass es sich bei der chronischen *P.-aeruginosa*-Infektion um eine fokale Infektion handelt, bei der neben irreversibel zerstörten Lungenbereichen auch gesunde Bereiche vorkommen (Meyer & Sharma, 1997, de Jong *et al.*, 2004). Die graduelle Abnahme der Lungenfunktion wird der Akkumulation dieser fokalen Infektionen zugeschrieben, die durch fokale, immunmedierte Zerstörung des respiratorischen Gewebes den Anteil an funktionellen Lungenalveolen mit der Zeit reduziert (Bjarnsholt *et al.*, 2009).

Es werden drei Kriterien zur Diagnostik von *P.-aeruginosa*-Biofilm-assoziierten Infektionen bei CF-Patienten beschrieben. Das erste Kriterium stellt die kontinuierliche Isolation von *P. aeruginosa* aus Sputum von CF-Patienten über mindestens sechs Monate dar. Zweites und drittes Kriterium sind die Feststellung des Alginat-produzierenden, mukoiden Phänotyps und der Anstieg der Antikörper gegen *P. aeruginosa* im Blut (Pressler *et al.*, 2006, Proesmans *et al.*, 2006).

Das Management von CF-Patienten setzt sich aus Langzeit-Therapien mit Antibiotika, mukolytischen Therapien und Strategien zur Hydratation der Atemwege zusammen (Smith *et al.*, 2017). Die Ansprechbarkeit auf Antibiotika hängt hier – besonders bei *P.-aeruginosa*-Infektionen – bedeutend vom Fortschritt

der Infektion ab. Werden Mikroorganismen bei noch asymptomatischen Patienten isoliert, kann die frühzeitige antibiotische Therapie mit größerer Wahrscheinlichkeit zur Elimination der Infektion führen (Stuart *et al.*, 2010). Die bronchoalveoläre Lavage stellt hierfür den Goldstandard dar. Bei chronischer *P.-aeruginosa*-Infektion ist lediglich eine suppressive Therapie mit Antibiotika möglich. Dabei erfolgt die Anwendung oral, intravenös oder durch Inhalation (Smith *et al.*, 2017).

Die Entstehung von Antibiotikaresistenzen durch anhaltende, suppressive Antibiotika-Therapie trägt im Laufe der Zeit zu einer schlechter werdenden Prognose bei (Lechtzin *et al.*, 2006). Auch nephrotoxische und ototoxische Nebenwirkungen von Aminoglykosiden, Schädigungen des physiologischen Mikrobioms und allergische Reaktionen stellen eine Belastung für die Patienten dar (Burrows *et al.*, 2003). Dennoch hat sich die Langzeit-Anwendung von Antibiotika für die Steigerung der Lebenserwartung von CF-Patienten als essentiell erwiesen (Smith *et al.*, 2017).

Maßnahmen zur Unterstützung der mukoziliären *Clearance* werden außerdem empfohlen, um die Abnahme der Lungenfunktion zu reduzieren (Conway *et al.*, 2014). DNase, hypertone Kochsalzlösung und die Inhalation von Mannitol werden dafür eingesetzt (Fuchs *et al.*, 1994, Elkins *et al.*, 2006, Bilton *et al.*, 2013). Auch die entzündungshemmende Therapie mit Ibuprofen ist besonders in den USA weit verbreitet (Smith *et al.*, 2017).

Des Weiteren wird an Anti-Biofilm-Strategien geforscht. Stickstoffmonoxid hat sich als effektives Mittel gegen bestehende *P.-aeruginosa*-Biofilme gezeigt, indem es die Auflockerung von Biofilm bewirkt und dadurch die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika erhöht (Barraud *et al.*, 2006). Auch der Einsatz von QS-Inhibitoren (z. B. Furanone) erwies sich als sinnvoll, um die Biofilm-Bildung zu reduzieren. Weitere Biofilm-spezifische Therapieansätze werden in Kapitel 2.4.3.4 beschrieben.

2.4.1.2. Wundinfektionen

Chronische, nicht heilende Wunden werden meist mit bakterieller Besiedelung und Biofilm-Bildung in Verbindung gebracht. James *et al.* postulierten nach einer prospektiven Studie, dass 60 % der chronischen Wunden Biofilme enthielten, während nur 6 % der akuten Wunden betroffen waren (James *et al.*, 2008). Percival

et al. vermuteten 2012 sogar, dass alle chronischen Wunden mit Biofilmen besiedelt seien (Percival *et al.*, 2012). Die *World Union of Wound Healing Societies* (WUWHS) veröffentlichte 2016 eine Stellungnahme zum Management von Biofilmen. Während Studien meist in 60-100 % der chronischen Wunden eine Beteiligung von Biofilm nachweisen, geht die WUWHS davon aus, dass die wahre Prävalenz von Biofilm in chronischen Wunden nahezu 100 % erreicht (Malone *et al.*, 2016).

Die physiologische Wundheilung beinhaltet Phasen der Koagulation, Entzündung, Zellproliferation und des Gewebeumbaus, woraufhin es zu einem schnellen Verschließen der Wunde innerhalb von 3-14 Tagen kommt (Davis *et al.*, 2008).

Eine nicht-heilende oder chronische Wunde zeigt keine Verbesserung nach vier Wochen oder heilt nicht innerhalb von acht Wochen (Mustoe *et al.*, 2006). Freiliegendes Unterhautgewebe bietet ein feuchtes, nährstoffreiches Milieu und eine Temperatur, die ideale Bedingungen für die mikrobielle Besiedelung liefert (Percival, 2017). Zu den am häufigsten aus infizierten Wunden isolierten Bakterienstämmen zählen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* und *Corynebacteriaceae* (Bessa *et al.*, 2015).

Nach primärer Kontamination der Wunde ist das gut funktionierende Immunsystem in der Lage, die Bakterien durch eine adäquate Entzündungsreaktion zu bekämpfen (Woods *et al.*, 2010). Gelingt das jedoch nicht, kommt es zur mikrobiellen Anhaftung und Kolonisation. In dieser Phase wird durch die eingeschränkte Proliferationsrate keine Immunantwort ausgelöst und die Wundheilung zunächst nicht beeinflusst (Percival, 2017). Anhaftende Bakterien bilden daraufhin einen Biofilm, wodurch meist eine stille Entzündung mit subklinischen Symptomen ausgelöst wird. Diese Phase wird als subklinische Infektion oder kritische Kolonisation bezeichnet (Percival & Cutting, 2010). Während der Biofilm weiter aufgebaut wird, steigt die Freisetzung von Exotoxinen, QS-Molekülen und eDNA. Diese Antigene aktivieren das Immunsystem und es kommt zu vermehrter Gewebeschädigung und verzögerter Heilung (Percival *et al.*, 2012).

Die meisten chronischen Wunden sind von mehreren Bakterienspezies betroffen, die synergistisch zusammenwirken. Dadurch können Bakterienspezies, die als nicht-virulente Hautbewohner eigentlich die Kolonisation von pathogenen Bakterien verhindern, selbst eine Virulenz entwickeln und den Wirt schädigen

(Dow *et al.*, 1999). Häufig sind grampositive, aerobe Bakterien die ersten Mikroorganismen, die eine Wunde besiedeln. Durch die bakterielle Vermehrung und die beginnende Entzündungsreaktion verändert sich die Mikroumgebung in der Wunde, sodass die Manifestation und Proliferation von weiteren grampositiven, gramnegativen und anaeroben Bakterien, Hefen und Pilzen möglich gemacht wird. Anaerobier werden durch routinemäßige Untersuchungen von Wunden meist nicht entdeckt, spielen aber eine nachgewiesene Rolle bei Wundinfektionen und in der Verzögerung der Wundheilung (Percival, 2017).

Chronische Wunden zeigen häufig Anteile an nekrotischem Gewebe, das fest im Wundbett verankert ist und die Wundheilung negativ beeinflussen soll (Stadelmann *et al.*, 1998). Die Bildung von nekrotischem Gewebe wird mit erhöhten, proinflammatorischen Zytokin-Levels und mit einer hohen Anzahl an infiltrierenden PMNs in Zusammenhang gebracht (Lu *et al.*, 2002). Die übermäßige Bildung von gelblichen Belägen im Wundbett ist ein weiteres Merkmal, das häufig mit chronischen Wunden assoziiert wird. Diese Beläge haften locker am Wundgewebe und bestehen aus Fibrin, Eiter, Leukozyten, abgestorbenen Zellen, Mikroorganismen und Proteinen – im Wesentlichen Abfallprodukte der immunmedierten Beseitigung von Zelldebris und Mikroorganismen. Die persistierende Entzündung in chronischen Wunden führt zu einer Überproduktion von Belägen, die als pathophysiologische Konsequenz erkennbar wird (Percival & Suleman, 2015).

Es wird davon ausgegangen, dass nekrotisches Gewebe und fibrinhaltige Beläge als biologische Oberflächen für die Anhaftung von Bakterien und die Bildung von Biofilmen dienen. Gleichzeitig stellen sie ein Reservoir für Mikroorganismen und Biofilme dar, die die Vermehrung und Verbreitung auf weitere, bisher nicht-kolonisierte Oberflächen erleichtern (Percival, 2017). Die daraus resultierende, überschießende Immunantwort führt zu weiterer Produktion von Belägen. Percival *et al.* vermuten, dass diese Beläge nicht nur Mikroorganismen beherbergen und deren Biofilm-Bildung erleichtern, sondern selbst einen makroskopisch sichtbaren Biofilm darstellen (Percival & Suleman, 2015).

Der genaue Mechanismus, durch den Biofilme den Heilungsprozess von Wunden beeinträchtigen, ist nicht genau bekannt. Bisherige Forschung deutet darauf hin, dass Wunden in einem Entzündungszustand gehalten werden, der die physiologische Wundheilung unmöglich macht. *P. aeruginosa* wird zusammen mit

S. aureus am häufigsten aus chronischen Wunden isoliert (Malone *et al.*, 2016). Die Fähigkeit von *P. aeruginosa*, durch die Sekretion von Rhamnolipid PMNs zu eliminieren, schwächt die Immunantwort gegenüber *P. aeruginosa* wesentlich (Jensen *et al.*, 2007). Durch die Zellyse der PMNs werden lokal proteolytische Enzyme freigesetzt, die eine proinflammatorische Wirkung haben und den Einstrom von PMNs weiter fördern (Wolcott *et al.*, 2008). Matrix-Metalloproteinasen, Neutrophile Elastasen und Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) werden im Zuge der chronischen Entzündung vermehrt freigesetzt und schädigen wirtseigene Proteine, die für die Wundheilung essentiell sind (Mast & Schultz, 1996).

2.4.1.3. Parodontitis

Schon seit Beginn der mikrobiellen Forschung ist bekannt, dass Zahnbelag ein Reservoir für Mikroorganismen ist. In Studien über mikrobielle Biofilm-Bildung auf der Zahnoberfläche konnten Costerton *et al.* erste Erkenntnisse über die Physiologie des Biofilms und den sesshaften Lebensstil der Bakterien sammeln. Wird das Gleichgewicht im Biofilm durch Veränderung der Nährstoffversorgung oder der umgebenden Immunantwort gestört, kann sich der gesunde Plaque-Biofilm in einen pathogenen Biofilm entwickeln. Dieser pathogene Biofilm auf der Zahnoberfläche führt zu Zahnerkrankungen wie Karies und Parodontitis (Seneviratne *et al.*, 2011).

Der Begriff Parodontitis bezeichnet die bakterielle Infektion des Zahnhalteapparats und umfasst ein weites Spektrum an chronischen Entzündungszuständen der Gingiva, des Knochens und des Bandapparates zur Befestigung des Zahns in der Alveole. Chronische Parodontitis entsteht aus unbehandelter Gingivitis und kann durch den Rückgang von Gingiva, Knochensubstanz und ligamentären Strukturen zu frühzeitigem Zahnverlust führen (Kinane *et al.*, 2017).

Chronische Gingivitis und Parodontitis werden durch Mikroorganismen des Zahnbelags ausgelöst und aufrechterhalten. Dieser Biofilm im Zahnbelag besteht aus etwa 150 verschiedenen Bakterienspezies, die bei jedem Menschen unterschiedlich zusammengesetzt sind. Während bei gesunden Erwachsenen grampositive Kokken und anaerobe, grampositive Stäbchen überwiegen, werden von erkrankten Patienten häufig gramnegative, anaerobe Bakterien und Spirochaeten isoliert. Statt einzelner Pathogene stellt jedoch die Dysbiose des

mikrobiellen Biofilms die pathogene Ursache dar, die für die Entstehung der Parodontitis verantwortlich ist (Feres *et al.*, 2016, Del Pozo, 2018).

Die Gewebeschädigung wird durch die überschießende Immunreaktion aufgrund der anwesenden Mikroorganismen verursacht (Kinane *et al.*, 2007). Es kommt zur Infiltration von PMNs und Lymphozyten, die jedoch nicht in der Lage sind, den chronisch persistierenden Biofilm zu eliminieren. Stattdessen führt die massive Immunantwort zur Resorption des alveolären Knochens durch Osteoklasten, zur Auflösung der ligamentären Strukturen durch Matrix-Metalloproteinasen und zur Bildung von Granulationsgewebe (Gemmell *et al.*, 1997, Benakanakere & Kinane, 2012, Sorsa *et al.*, 2016). Diese pathophysiologische Situation hält an, bis der Zahn aus der Alveole gelöst oder der Biofilm mitsamt dem Granulationsgewebe therapeutisch entfernt wird (Kinane *et al.*, 2017).

Die Ziele des Managements von Parodontitis sind die Kontrolle der Entzündung, das Verhindern der progressiven Verschlechterung und die Erhaltung eines funktionalen und schmerzfreien Gebisses. Dabei stellt die mechanische Entfernung des Biofilms den ersten und wichtigsten Schritt dar. Bestehen im Anschluss weiterhin Entzündungszustände und eine aktive Erkrankung, sind zusätzliche Therapiemethoden nötig. Neben der chirurgischen Versorgung betroffener Bereiche können Antibiotika und immunmodulierende Therapien nötig sein. Zur Prävention von rezidivierenden Erkrankungen ist außerdem eine adäquate Mundhygiene essentiell (Kinane *et al.*, 2017).

2.4.2. Biofilm-assoziierte Infektionen in der Veterinärmedizin

Obwohl die Forschung über Biofilm-assoziierte Infektionen in der Veterinärmedizin bisher deutlich weniger intensiv betrieben wurde als in der Humanmedizin, ist davon auszugehen, dass Biofilme in einem ähnlichen Ausmaß bei bakteriellen Infektionen vorkommen. Die Beteiligung von Biofilm wird unter anderem bei Mastitiden, Wundinfektionen, Endometritiden und Pneumonien vermutet (Clutterbuck *et al.*, 2007, Ferris *et al.*, 2016).

Cochrane *et al.* untersuchten chronische Wunden bei Pferden und konnten bei der Mehrzahl der analysierten Wunden bakterielle Aggregate in den Biopaten feststellen. Die Bakterien waren in einer polymeren Matrix eingebettet und zeigten deutliche Merkmale eines Biofilms (Cochrane *et al.*, 2009). Auch Westgate *et al.* kamen bei der Untersuchung chronischer Wunden bei Pferden auf dieses Ergebnis.

Sie konnten außerdem nachweisen, dass Bakterien, die aus chronischen Wunden isoliert wurden, ein höheres Potenzial zur Biofilm-Bildung aufwiesen als entsprechende Isolate der Hautflora (Westgate *et al.*, 2011).

Die bovine Mastitis, eine der relevantesten Erkrankungen der Rinder mit weltweit hoher Inzidenz, stellt durch ihren häufig persistierenden Krankheitsverlauf eine besondere Herausforderung an die Veterinärmedizin dar. Infektiöse Mastitiden werden in der Regel durch die Infektion mit *S. aureus*, *Streptococci* und *E. coli* ausgelöst – Bakterienspezies, deren Fähigkeit zur Biofilm-Bildung unumstritten ist (Gomes *et al.*, 2016). Die bovine Mastitis ähnelt in ihrer Pathogenese den infektiösen Erkrankungen in der Humanmedizin, die mit Biofilm-Bildung in Zusammenhang gebracht werden (Melchior *et al.*, 2006). Auch wenn es bisher keine *in-vivo*-Studien zur Biofilm-Bildung im bovinen Euter gibt, lassen *in-vitro*-Studien mit Mastitis-Pathogenen diese stark vermuten (Melchior *et al.*, 2006). Subinhibitorische Konzentrationen von Enrofloxacin, ein häufig bei klinischer Mastitis eingesetztes Antibiotikum, konnten bei Mastitis-*E.coli*-Isolaten die Biofilm-Bildung fördern. Costa *et al.* schrieben das Wiederauftreten der Erkrankung der Entstehung von Biofilm zu (Costa *et al.*, 2012). Die Persistenz der Mikroorganismen trotz antibiotischer Behandlung unterstützt diese Hypothese zusätzlich (Melchior *et al.*, 2006). Auch Milanov *et al.* führen das häufige Therapieversagen bei chronischen Mastitiden auf die Bildung von Biofilm im Eutergewebe zurück (Milanov *et al.*, 2010).

Ein weiteres Beispiel für chronische Infektionen in der Veterinärmedizin ist die bakterielle Endometritis der Stute. Auch hier wird die Bildung von Biofilm vermutet – nicht zuletzt wegen der eingeschränkten Therapierbarkeit mit Antibiotika. *E. coli*, *P. aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* werden häufig aus equinen Uteri isoliert und mit reduzierter Fruchtbarkeit der Stute in Zusammenhang gebracht. Es wird davon ausgegangen, dass diese Bakterien durch ihre Biofilm-Bildung vor dem Immunsystem und der Behandlung mit lokalen Antibiotika geschützt sind und dabei eine chronische Entzündung im Uterus aufrechterhalten (Causey, 2006, LeBlanc, 2010).

Die Beteiligung von Biofilm bei weiteren, häufig chronisch verlaufenden Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Dabei wird die Bildung von Biofilm zum Beispiel auch bei Pneumonien durch *Actinobacillus pleuropneumoniae* beim Schwein vermutet (Tremblay *et al.*, 2017). Auch wenn es

zahlreiche *in-vitro*-Studien zur Biofilm-Bildung der betreffenden Pathogene gibt, ist der *in-vivo*-Nachweis bisher oft nicht abschließend erfolgt.

2.4.3. Eigenschaften Biofilm-assoziiierter Infektionen

2.4.3.1. Typische Merkmale

Bakterien im Biofilm sind in der Lage, chronische Infektionen auszulösen, die mit anhaltender Entzündung und Gewebeschädigung einhergehen (Costerton *et al.*, 2003). Chronische Infektionen persistieren trotz antibiotischer Therapie und Immun- und Entzündungsreaktionen des Wirts. Im Gegensatz zur Kolonisation werden chronische Infektionen durch eine Immunantwort und persistente Pathologie charakterisiert (Hoiby *et al.*, 2010).

Akute Infektionen treten plötzlich auf und verbreiten sich meist schnell. Sie werden oft durch die wirtseigene Immunantwort kontrolliert, sodass ein medizinisches Eingreifen nicht immer erforderlich ist. Versagt die Immunabwehr, kann die Infektion durch therapeutische Maßnahmen zügig begrenzt und eliminiert werden (Roberts *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu sind chronische, Biofilm-assoziierte Infektionen auch unter intensiver medikamentöser Therapie nur schwer zu beseitigen. Häufig ist die (chirurgische) Entfernung des Biofilms mitsamt dem infizierten Gewebe die einzige Möglichkeit, das erneute Aufflammen der Infektion zu verhindern (Dowsett, 2013, Kinane *et al.*, 2017).

Parsek *et al.* stellten 2003 Kriterien zur Definition von Biofilm-assoziierten Infektionen vor (Parsek & Singh, 2003):

- a. Infizierende Bakterien sind an ein Substrat oder an eine Oberfläche gebunden.
- b. Direkte Untersuchung des infizierten Gewebes zeigt Bakterien, die in Zellaggregaten oder Mikrokolonien leben und von extrazellulärer Matrix umgeben sind.
- c. Die Infektion ist im Allgemeinen auf eine bestimmte Lokalisation beschränkt. Obwohl bakterielle Streuung auftreten kann, handelt es sich dabei um ein sekundäres Phänomen.
- d. Die Infektion ist nicht oder nur schwer durch Antibiotika zu eliminieren, obwohl der verantwortliche Organismus in seinem planktonischen Zustand sensibel gegenüber den angewandten Antibiotika ist.

Hall-Stoodley *et al.* ergänzten diese Kriterien um weitere zwei (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009):

- a) Kultur-negative Ergebnisse trotz starker Vermutung der Infektion mit dem betreffenden Erreger
- b) Ineffektive Immunabwehr, nachgewiesen durch bakterielle Zellaggregate, die in wirtseigenem Gewebe von Entzündungszellen umgeben sind

Außerdem wird das Vorliegen einer chronischen oder rezidivierenden Infektion selbst als ein diagnostisches Kriterium vorgeschlagen (Hoiby *et al.*, 2010).

Biofilm-assoziierte Infektionen erfüllen häufig nicht die Henle-Koch-Postulate, da der eindeutige kulturelle Nachweis eines ursächlichen Pathogens oft problematisch ist. Nicht nur handelt es sich bei Biofilmen häufig um polymikrobielle Gemeinschaften, oft sind auch Mikroorganismen beteiligt, deren Kultivierung sehr anspruchsvoll ist (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Am Beispiel von Parodontitis wird deutlich, dass Veränderungen im polymikrobiellen Biofilm das Gleichgewicht zwischen Biofilm und Immunantwort des Wirtes stören können. Erst dadurch entwickelt sich die typische Pathogenese anhaltender Entzündungszustände. Im Gegensatz zu akuten Infektionen kann kein eindeutig ursächlicher Erreger identifiziert werden (Kinane *et al.*, 2017).

2.4.3.2. Wechselwirkungen mit dem Immunsystem

Das wirtseigene Immunsystem ist meist machtlos gegenüber Biofilm-assoziierten Infektionen, da Leukozyten, Antikörper und das Komplementsystem häufig nicht in der Lage sind, Biofilme zu beseitigen (Wolcott *et al.*, 2008). Die Biofilm-Gemeinschaft interagiert mit dem umliegenden Gewebe, sodass eine stabile Anhaftung, eine kontinuierliche Nährstoffversorgung und eine parasitäre Beziehung zu dem Wirt entstehen. Umliegendes Gewebe entwickelt Immunreaktionen und Reparaturmechanismen, die miteinander kollidieren, eine überschießende Immunantwort auslösen und dadurch eine chronische Infektion fördern. Der Wirt versorgt die bakterielle Gemeinschaft mit notwendigen Nährstoffen und ermöglicht ihr ein stabiles Umfeld inmitten permanenter Entzündung (Wolcott *et al.*, 2008).

Chronische Biofilm-assoziierte Infektionen zeichnen sich durch anhaltende Entzündungszustände aus, die in ähnlichem Muster bei verschiedenen Krankheitsbildern auftreten (Del Pozo, 2018). Bakterien im Biofilm sind in der

Lage, die Kontrollmechanismen zum Schutz vor überschießenden Immunreaktionen außer Kraft zu setzen und den Zustand einer überschießenden Entzündungsreaktion aufrecht zu erhalten (Wolcott *et al.*, 2008). Eine Möglichkeit der Steuerung erfolgt über die übermäßige Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die im Zuge der Aktivierung von *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) ausgeschüttet werden. Bakterien im Biofilm können über molekulare Mechanismen ein Überangebot an Substrat zur Bindung an TLRs synthetisieren und so die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in hohem Maße aktivieren. In chronischen Wunden können dauerhaft Zytokin-Konzentrationen nachgewiesen werden, die das physiologische Level um ein Vielfaches übersteigen (Wolcott *et al.*, 2008).

P. aeruginosa nutzt hierbei QS-Moleküle, die direkt auf Wirtszellen wirken und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen induzieren können (Jahoor *et al.*, 2008). Andere Pathogene, unter anderem *S. aureus*, exprimieren Moduline und Superantigene (z. B. Enterotoxine), die eine massive Ausschüttung von Zytokinen auslösen (Llewelyn & Cohen, 2002). Gramnegative Bakterien im Biofilm können Lipopolysaccharide (LPS) und Membranvesikel aus LPS in die Biofilm-Umgebung freisetzen und durch ihre chemotaktische Wirkung auf PMNs die Entzündungsantwort aufrechterhalten (Jensen *et al.*, 1993, Schooling & Beveridge, 2006).

Durch die kontinuierliche Ablösung von Teilen des Biofilms und planktonischen Bakterienzellen kann das Immunsystem zusätzlich geködert und die Immunreaktion gefördert werden. Bakterien im Biofilm können Bestandteile des Entzündungsexsudats als Nährstoffe nutzen und so das Überleben der Bakteriengemeinschaft durch kontinuierliche Nährstoffversorgung sichern. Durch immunsuppressive Therapien könnte die Nährstoffzufuhr reduziert und das Bakterien-Wachstum gebremst werden (Wolcott *et al.*, 2008).

Die exzessive Ansammlung von PMNs ist ein typisches Merkmal von chronischen Wunden und anderen chronischen Infektionen, die mit Biofilmen in Verbindung gebracht werden (Döring, 1997, Yager & Nwomeh, 1999, Diegelmann, 2003). Während der physiologischen Immunantwort exprimieren PMNs nach Aufnahme eines Pathogens Oberflächenproteine wie Phosphatidylserin, um von Makrophagen phagozytiert zu werden. Dieser Mechanismus verhindert, dass PMNs am Ort der Entzündung zerfallen und durch Freisetzung proteolytischer Enzyme das

umliegende Gewebe schädigen (Fadok *et al.*, 1992, Vandivier *et al.*, 2002, Guzik *et al.*, 2007). Bakterielle LPS interferieren mit Phosphatidylserin auf der Oberfläche der PMNs und verhindern, dass diese PMNs von Makrophagen erkannt und abgebaut werden (Wolcott *et al.*, 2008). Dadurch kommt es zur lokalen Freisetzung von Elastase, Metalloproteinasen und Entzündungsmediatoren (Fox *et al.*, 2010). Spaltprodukte der Elastase stimulieren ihrerseits TLR-Rezeptoren, woraufhin erneut proinflammatorische Zytokine produziert werden (Wolcott *et al.*, 2008). Das schließt den Kreis der chronischen Pathogenitäts-Mechanismen bei Biofilm-assoziierten Infektionen, führt zu unkontrollierter Proteaseaktivität und daraus resultierender Schädigung des umliegenden Gewebes (siehe Abbildung 4) (Wolcott *et al.*, 2008).

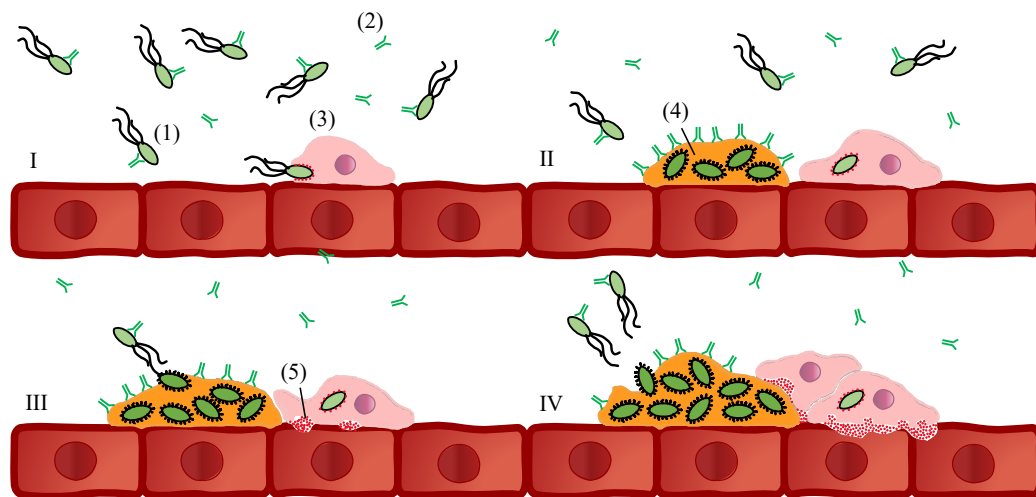


Abbildung 4: Schädigung des umliegenden Gewebes durch ineffektive Immunabwehr

I: Planktonische Bakterienzellen (1) können durch Antikörper (2) opsonisiert und durch Phagozyten (3) eliminiert werden. II: Bakterienzellen im Biofilm (4) dagegen sind vor der Opsonisierung durch Antikörper geschützt. III und IV: Die Ausschüttung von proteolytischen Enzymen (5) in der Umgebung des Biofilms führt zur Schädigung des umliegenden Gewebes.

In Wunden führt die Aktivität von Proteasen und Elastase zur Apoptose von Zellen des umliegenden Gewebes, die an der Reparatoren des verletzten Gewebes beteiligt sind (Yang *et al.*, 1996). Inhibitoren der Metalloproteasen (*tissue inhibitors of metalloprotease*, TIMP) sind während der physiologischen Wundheilung für den Schutz des umliegenden Gewebes verantwortlich. In chronischen, Biofilm-assoziierten Wunden fehlen diese TIMPs, wodurch ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen entsteht (Patel *et al.*, 2016).

Bakterien im Biofilm können jedoch auch direkt von erhöhter Protease-Aktivität in ihrer Umgebung profitieren. *S. epidermidis* benötigt zur initialen Biofilm-Bildung

aktiviertes Aap-Protein. Dieses Protein wird durch wirtseigene Proteasen proteolytisch verändert, woraufhin es zur bakteriellen Adhäsion kommt (Rohde *et al.*, 2005). Rhode *et al.* schlossen daraus, dass *in-vivo*-Effektormechanismen der angeborenen Immunität direkt die proteinabhängige Zellaggregation und Biofilmbildung von *S. epidermidis* induzieren können und damit dem Pathogen ermöglichen, sich vor der Elimination durch Phagozytose zu schützen (Rohde *et al.*, 2005).

Ein weiterer Mechanismus zur Resistenz gegenüber dem Immunsystem scheint die eingeschränkte Wirkung von Entzündungszellen im Biofilm zu sein. Schon 1980 zeigten Lam *et al.* durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, dass Entzündungszellen und Antikörper zwar den Biofilm umschlossen, ihn aber nicht penetrierten (Lam *et al.*, 1980). Leid *et al.* zeigten, dass Leukozyten in das Gefäßsystem von *S.-aureus*-Biofilm eindringen konnten, aber gegenüber den Bakterienzellen keine phagozytische Wirkung zeigten (Leid *et al.*, 2002). Eine mögliche Erklärung dafür sind Bestandteile der Biofilm-Matrix, die Entzündungszellen in ihrer Wirkung einschränken. Bei *S.-epidermidis*-Biofilmen scheint das intrazelluläre Adhäsin PIA Schutz vor der Phagozytose durch PMNs zu bieten (Vuong *et al.*, 2004). Auch bei *P.-aeruginosa*-Biofilmen hat die Matrix eine schützende Funktion: PMNs wurden innerhalb der EPS immobilisiert und zeigten eine verringerte oxidative Wirkung, gemessen am H_2O_2 -Gehalt im Biofilm. Bakterien im Biofilm können H_2O_2 mit Hilfe der bakteriellen Katalase zurück zu Sauerstoff konvertieren, sodass neben der verbesserten Sauerstoffversorgung der Bakterienzellen die oxidative Wirkung auf die Zellen verringert wird. Durch die Immobilisation der PMNs im Biofilm wird mit der Zeit ein Schutzwall gebildet, der die Bakterienzellen vor der oxidativen Wirkung weiterer PMNs schützt. Wenn sich während einer Infektion große Mengen an PMNs an diesem Schutzwall anlagern, schädigt deren freigesetztes H_2O_2 vornehmlich benachbarte Entzündungszellen, sodass es zu einer Reduktion der Immunaktivität gegenüber den Bakterienzellen kommt (Jesaitis *et al.*, 2003).

Die Freisetzung von ROS, insbesondere H_2O_2 , führt bei *P. aeruginosa* zu der Entwicklung von mukoiden Stämmen, die durch eine Überproduktion von Alginate charakterisiert sind (Mathee *et al.*, 1999). Diese geht mit der Bildung von stabilen, gut strukturierten Biofilmen einher und führt zu erhöhter Resistenz gegenüber Antibiotika und dem Immunsystem (Hay *et al.*, 2009, Goltermann & Tolker-

Nielsen, 2017). Dabei sind *P.-aeruginosa*-Zellen durch Alginate vor IFN- γ (Interferon-gamma) -mediierter Elimination durch Makrophagen (Leid *et al.*, 2005) und vor der Opsonisierung zur Phagozytose geschützt (Pier *et al.*, 2001). Bjarnsholt *et al.* zeigten, dass die erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber H_2O_2 und PMNs QS-abhängig ist. Die Freisetzung von QS-Signalmolekülen führte zu veränderter Aktivierung der PMNs, wodurch die Freisetzung von ROS reduziert wurde. Außerdem scheint die Entwicklung von mukoiden Stämmen durch QS-mediierte Genexpression gesteuert zu sein (Bjarnsholt *et al.*, 2005).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* in Anwesenheit von PMNs vermehrt Biofilm bildete und dabei vermutlich PMN-Anteile in die Biofilm-Matrix integriert. So können durch PMNs gebildete Polymere, DNA und Aktin als ein Gerüst für die Biofilm-Bildung dienen (Walker *et al.*, 2005). Die QS-abhängige Produktion von Rhamnolipid führt zusätzlich zur Lyse von umliegenden PMNs, wodurch weitere DNA freigesetzt wird, die als Matrix-Bestandteil genutzt werden kann (Jensen *et al.*, 2007). Gleichzeitig konnte *P. aeruginosa* durch die Sekretion von bakterieller Elastase Bestandteile des Komplementsystems inaktivieren und sich vor dessen Opsonisierung schützen (Schultz & Miller, 1974).

In den letzten Jahren wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Biofilm und dem Vorkommen von *neutrophil extracellular traps* (NETs) herausgefunden. NETs werden in Anwesenheit von Pathogenen von aktivierten PMNs freigesetzt und dienen der Immobilisation der Erreger, um Virulenzfaktoren unschädlich zu machen und Bakterien zu eliminieren. Sie bestehen aus DNA, Granula-Proteinen und antimikrobiellen Peptiden (Brinkmann *et al.*, 2004) und werden im Zuge der *suicidal NETosis* (NET-Freisetzung, die mit Zelllyse einhergeht) oder *vital NETosis* (NET-Freisetzung über Vesikel durch die intakte Zellmembran) in die Umgebung abgegeben (Yipp & Kubes, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass NETs vor allem dann freigesetzt werden, wenn die Erreger nicht durch Phagozytose zu eliminieren sind – Biofilme scheinen hier einen bedeutenden Auslöser für die NET-Freisetzung darzustellen. NETs stimulieren ihrerseits die Produktion von Biofilm, sodass ein positiver *Feedback*-Mechanismus entsteht. Als Folge wird ein stabiler Biofilm gebildet, der von großen Mengen an NETs umgeben ist (Papayannopoulos, 2019).

Bei Studien mit *S.-aureus*-Biofilmen wurde herausgefunden, dass diese eine Dysfunktion bei Makrophagen auslösen und sich dadurch vor Phagozytose

schützen. Obwohl der Einstrom von Makrophagen während der frühen Infektion erhöht war, waren diese nicht in der Lage, die Bakterien hinreichend zu beseitigen – nur ein kleiner Anteil der Makrophagen bewegte sich zur Biofilm-Oberfläche. Viele zeigten eine erhöhte Expression von Arginase-1, was mit einer reduzierten Fähigkeit zur effektiven Beseitigung von Bakterien assoziiert wird. Die Biofilme schienen außerdem einen Untergang der Makrophagen auszulösen, dessen genauer Mechanismus bisher nicht geklärt ist. Bakterielle Toxine oder die hypoxische Umgebung im Biofilm könnten dabei eine Rolle spielen (Thurlow *et al.*, 2011).

Es wird vermutet, dass Makrophagen Bakterien im Biofilm nur schwer opsonisieren können. Die Anlagerung von IgG und dem Komplementfaktor C3b zur Aktivierung des Komplementsystems war bei Studien mit *S. epidermidis* reduziert, wodurch die mangelnde Erkennbarkeit durch Entzündungszellen erklärt werden könnte (Kristian *et al.*, 2008). Wurden Teile des Biofilms mechanisch abgespalten, waren Makrophagen wieder in der Lage, die darin enthaltenen Bakterien zu phagozytieren (Thurlow *et al.*, 2011).

Diffusionsstudien wiesen außerdem daraufhin, dass die Wirkung von Antikörpern durch eingeschränkte Diffusion in den Biofilm vermindert sein könnte. IgG blieben in der Peripherie von Biofilmeinheiten und konnten nicht in die EPS-Matrix penetrieren. Laut Cerca *et al.* waren Antikörper nicht in der Lage, durch Opsonisierung die Elimination von Bakterienzellen zu vermitteln (Cerca *et al.*, 2006). Durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen wird jedoch eine Immunkomplex-mediierte Entzündung ausgelöst und das umliegende Gewebe geschädigt (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Diese Gewebeschädigung kann bei Parodontitis und der chronischen *P. aeruginosa*-Infektion bei Mukoviszidose-Patienten beobachtet werden (siehe 2.4.1.1. und 2.4.1.3.).

Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von *P. aeruginosa* durch die Bindung von Antikörpern verhindert werden konnte. Antikörper könnten daher eine Rolle bei der Prävention von Biofilmen spielen (Tashiro *et al.*, 2008).

2.4.3.3. Wechselwirkungen mit Antibiotika

Bakterienzellen können durch verschiedene Anpassungsmechanismen Resistenz, Toleranz und Persistenz gegenüber Antibiotika entwickeln und damit die effektive Behandlung mit Antibiotika erschweren. Bakterien im Biofilm haben durch schützende Substanzen in der Matrix, ihre Kommunikations-Mechanismen und ihre

Fähigkeit zum genetischen Austausch die besten Voraussetzungen für die Entwicklung von Resistenz, Toleranz und Persistenz und sind dementsprechend schlechter durch Antibiotika zu eliminieren als ihre planktonischen Gegenspieler (Hall & Mah, 2017).

Resistenz beschreibt die genetisch vererbte Fähigkeit von Mikroorganismen, unter hohen antibakteriellen Konzentrationen zu wachsen, unabhängig von der Dauer der Behandlung. Sie wird anhand der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für das jeweilige Antibiotikum gemessen (Brauner *et al.*, 2016). Resistenz ist typischerweise mit zahlreichen molekularen Mechanismen assoziiert, die durch Mutationen entstehen und in die nächste Bakteriengeneration weitergegeben werden (Depardieu *et al.*, 2007, Blair *et al.*, 2015). Diese Mechanismen verringern die Wirksamkeit des Antibiotikums, sodass im resistenten Stamm eine höhere Konzentration nötig ist, um die Bakterien zu eliminieren, als im empfänglichen Stamm (Chait *et al.*, 2007).

Als Toleranz bezeichnet man die Fähigkeit von Bakterien, eine vorübergehende Antibiotika-Anwendung in einer Konzentration zu überleben, die üblicherweise letale Auswirkungen auf die Bakterien hätte (Handwerger & Tomasz, 1985). Toleranz gegenüber beta-Laktam-Antibiotika tritt auf, wenn Bakterien in einem Zustand langsameren Wachstums – wie beispielsweise im Biofilm – sind (Tuomanen *et al.*, 1986). Toleranz kann einerseits durch genetische Mutationen erlangt werden, andererseits durch veränderte Umweltbedingungen (z. B. schlechte Wachstumsbedingungen) (McDermott, 1958). Auch Antibiotika selbst können in Bakterien einen Wachstumsarrest auslösen, wodurch die Bakterien sich vor der letalen Wirkung des Antibiotikums schützen (Handwerger & Tomasz, 1985). Im Gegensatz zu resistenten Stämmen, die eine erhöhte Antibiotika-Konzentration erfordern, ist bei der Behandlung von toleranten Stämmen eine verlängerte Behandlungszeit erforderlich (Brauner *et al.*, 2016). Die quantitative Messung der Toleranz erfolgt über die Bestimmung der minimalen Behandlungszeit (*minimal duration for killing*, MDK). Die Erhöhung der Konzentration führt nicht zu einer besseren Ansprechbarkeit der toleranten Stämme. Es wird angenommen, dass es bei toleranten Stämmen in hohen Konzentrationen zu einer Antibiotika-Sättigung kommt, deren Wirkung nur noch von der Dauer der Behandlung abhängt (Mattie, 2000).

Persistenz beschreibt den Zustand, in dem der Großteil einer Bakterien-Population durch antibiotische Behandlung abstirbt, eine Subpopulation (meist weniger als ein Prozent) jedoch überlebt. Bakterien dieser Subpopulation werden dann als Persisterzellen bezeichnet, sie können entweder zeit- oder dosisabhängig persistent sein. Zeitabhängige Persistenz entsteht, wenn der persistente Teil der Population tolerant ist (ausgelöst durch molekulare Mechanismen, die einen Wachstumsarrest in der Subpopulation bewirken); dosisabhängige Persistenz tritt auf, wenn der persistente Teil resistent ist (ausgelöst durch Überexpression von Resistenzfaktoren in der Subpopulation) (Brauner *et al.*, 2016).

Der Biofilm-Phänotyp von Bakterienzellen ist erstaunlich resistent gegenüber Antibiotika (Nickel *et al.*, 1985). Als die angeborene Widerstandsfähigkeit von Biofilmen gegenüber industriellen Bioziden erstmals entdeckt wurde, wurde dieses Phänomen der mangelhaften Penetration durch die Biofilm-Matrix zugeschrieben (Costerton *et al.*, 1987). Es wurde jedoch schnell erkannt, dass die Matrix die Antibiotika-Diffusion nur dann limitiert, wenn Matrix-Bestandteile direkt mit dem Antibiotikum reagieren (Stewart, 1996).

Die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zwischen dem planktonischen Phänotyp und dem Biofilm-Phänotyp der Bakterien zeigt die Gegenüberstellung der benötigten Konzentrationen zur Eliminierung der Bakterien. Tabelle 1 stellt die benötigte Konzentration für ausgewählte Bakterien-Stämme und Antibiotika dar (Donlan & Costerton, 2002).

Tabelle 1: Empfindlichkeit von planktonischen und im Biofilm befindlichen Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika (Donlan & Costerton, 2002)

Organismus	Antibiotikum	MIC / MBC des plankt. Phänotyps (µg/ml)	Effektive Konz. gegen Biofilm-Phänotyp (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	Vancomycin	2 (MBC)	20
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	1 (MIC)	>1024
<i>E. coli</i>	Ampicillin	2 (MIC)	512
<i>P. pseudomallei</i>	Ceftazidime	8 (MBC)	800
<i>Strep. sanguis</i>	Doxycyclin	0,062 (MIC)	3,15

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich intensiv mit den verschiedenen Mechanismen, die zu der besonderen Widerstandsfähigkeit der Bakterien im Biofilm gegenüber Antibiotika führen. Im Folgenden soll ein repräsentativer Teil

dieser Mechanismen dargestellt werden: die Bedeutung der Biofilm-Matrix, die Auswirkungen von Nährstoffmängeln und Stressantworten, die genetische Diversität der Zellen im Biofilm, die Bedeutung von QS und die synergistischen Effekte von polymikrobiellen Biofilmen.

Bedeutung der Biofilm-Matrix

Es wird häufig angenommen, dass die Penetration von Antibiotika durch die Biofilm-Matrix vermindert und die Bakterienzellen so vor der antibakteriellen Wirkung geschützt sind. Tatsächlich trifft das nicht in allen Fällen zu (Hall & Mah, 2017). In Versuchen mit *E.-coli*-Biofilmen untersuchten Stone *et al.* die Diffusion von Tetrazyklin durch die Matrix. Bereits nach zehn Minuten erreichte Tetrazyklin alle Zellen im Biofilm ohne Auswirkungen auf deren Viabilität (Stone *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Studien mit Staphylokokken-Biofilmen und Rifampicin, Amikacin und Ciprofloxacin (Dunne *et al.*, 1993, Zheng & Stewart, 2002, Stewart *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2010).

Im Gegensatz dazu war in *P.-aeruginosa*-Biofilmen eine verminderte Penetration von Tobramycin zu erkennen, ausgelöst durch Wechselwirkungen von Tobramycin mit Matrix-Bestandteilen wie eDNA. Dagegen diffundierte Ciprofloxacin schnell und effektiv in *P.-aeruginosa*-Biofilme (Tseng *et al.*, 2013).

Auch Unterschiede im Versuchsaufbau spiegelten sich in widersprüchlichen Ergebnissen wider. Versuche mit *P. aeruginosa* und Ciprofloxacin ergaben sowohl eine verminderte (Suci *et al.*, 1994) als auch eine effektive Penetration in den Biofilm. Unterschiede im Phosphatgehalt der Kulturmedien führten zu veränderter Biofilmdicke und daraus resultierend zu gegensätzlichen Ergebnissen (Vrany *et al.*, 1997).

Die Bedeutung der verminderten Penetration von Antibiotika hängt daher von dem jeweiligen Bakterien-Stamm, der Art des Antibiotikums und den Wachstumsbedingungen des Biofilms ab, sodass keine allgemeine Schlussfolgerung möglich ist. Besonders der Umstand, dass gut penetrierende Antibiotika oft dennoch keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterienzellen haben, gibt Grund zur Annahme, dass weitere molekulare Mechanismen für die erhöhte Widerstandsfähigkeit verantwortlich sind (Hall & Mah, 2017).

Den Polysacchariden Psl und Pel von *P.-aeruginosa*-Biofilmen werden als Matrix-Bestandteilen neben der Bedeutung für die Biofilm-Formation auch eine Bedeutung für die Antibiotika-Wirksamkeit zugesprochen. Billings *et al.* postulierten, dass Psl bestimmte Antibiotika durch elektrostatische Wechselwirkungen sequestriert und dadurch unwirksam macht. Versuche mit Colistin, Polymyxin B, Tobramycin und Ciprofloxacin gaben einen Hinweis darauf (Billings *et al.*, 2013). Studien mit Biofilmen von Pel-defizienten *P.-aeruginosa*-Stämmen zeigten eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Tobramycin und Gentamicin (Colvin *et al.*, 2011). Pel scheint mit eDNA in der Matrix zu interagieren und trägt möglicherweise zusammen mit eDNA zu einer erhöhten Antibiotika-Resistenz in *P.-aeruginosa*-Biofilmen bei (Jennings *et al.*, 2015).

eDNA als ein wichtiger und vielfältiger Matrix-Bestandteil ist auch für die Antibiotika-Resistenz von großer Bedeutung. Chiang *et al.* fanden heraus, dass DNA, die *P.-aeruginosa*-Biofilmen exogen zugeführt wurde, mit in die bestehende Biofilm-Matrix einbezogen wurde und damit ein zwei- bis dreifaches Level an Resistenz gegenüber Tobramycin und Gentamicin bewirkte (Chiang *et al.*, 2013).

Die Freisetzung von endogener eDNA konnte außerdem durch die Behandlung mit bestimmten Antibiotika gesteigert werden. Subinhibitorische Konzentrationen von Methicillin führten in *S.-aureus*-Biofilmen zu vermehrter eDNA-Ausscheidung (Kaplan *et al.*, 2012). Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche mit *S.-epidermidis*-Biofilmen und Vancomycin. eDNA, die eine hohe Bindungsaffinität für Vancomycin hat, kann Zellen im Biofilm so verstärkt vor der antibakteriellen Wirkung schützen (Doroshenko *et al.*, 2014). Es wird vermutet, dass eDNA durch physikalische Wechselwirkungen mit Antibiotika die Zellen im Biofilm schützt und durch diese Antibiotika-Sequestrierung als ein Schutzschild dient (Chiang *et al.*, 2013).

Ein weiterer Mechanismus, der eDNA-abhängig zu erhöhter Antibiotika-Resistenz führt, ist die Bindung von Kationen wie Mg^{2+} . Durch die kationenlimitierte Umgebung wird in *P. aeruginosa* die Spermidin-Synthese gefördert. Spermidin ist ein Polyamin an der äußeren Zellmembran, das die Membranpermeabilität für Aminoglykoside und kationische antimikrobielle Peptide reduziert (Johnson *et al.*, 2012).

Zusätzlich zu ihrer physikalischen Rolle im Schutz gegen Antibiotika ist eDNA im Zuge des HGTs für die Verbreitung von Resistenzgenen innerhalb der Bakterien-Population im Biofilm von großer Bedeutung (Hall & Mah, 2017).

Die Wirkung von Antibiotika auf Zellen im Biofilm kann außerdem durch Enzyme wie Beta-Laktamasen in der Matrix beeinträchtigt werden. Beta-Laktamasen spalten Beta-Laktam-Antibiotika und hindern sie daran, Zellen im Biofilm zu erreichen (Hall & Mah, 2017).

Die Sekretion von AmpC Beta-Laktamase in die Matrix von *P.-aeruginosa*-Biofilmen ist ein wichtiger und klinisch relevanter Faktor für die Resistenz gegen Beta-Laktam-Antibiotika bei *P. aeruginosa* (Giwerzman *et al.*, 1991, Bagge *et al.*, 2000). Bagge *et al.* fanden heraus, dass die Expression von AmpC durch Ceftazidim und Imipenem gesteigert werden konnte. Bei Versuchen mit steigenden Konzentrationen von Imipenem war eine konzentrationsabhängige Expression von AmpC erkennbar, die in der Biofilm-Peripherie beginnend und bei steigenden Konzentrationen auch in tieferen Schichten nachgewiesen werden konnte (Bagge *et al.*, 2004).

Auswirkungen von Nährstoffmängeln und Stressantworten

Die physiologische Heterogenität im Biofilm ist charakterisiert durch Unterschiede in Genexpression, Stoffwechselaktivität und Phänotyp der Zellen im Biofilm. Heterogenität entsteht durch Sauerstoff- und Nährstoffgradienten innerhalb des Biofilms, da oberflächlich liegende Zellen Sauerstoff und Nährstoffe verstoffwechseln, bevor sie tiefer liegende Zellen erreichen (Stewart & Franklin, 2008). Zellen, die in hypoxischen Bereichen innerhalb des Biofilms leben, zeigen eine reduzierte metabolische Aktivität und befinden sich in einem Zustand, der der stationären Phase des Bakterien-Wachstums ähnelt (Stewart *et al.*, 2016). Es wird davon ausgegangen, dass diese langsame Wachstumsrate zu vermehrter Toleranz gegenüber Antibiotika führt, da diese am effektivsten gegen schnell wachsende Zellen wirken (Evans *et al.*, 1991, Zheng 2004).

Borriello *et al.* erkannten, dass die Behandlung von Biofilmen mit verschiedenen Antibiotika unter anaeroben Bedingungen eine größere Toleranz zeigten als die Kontrollgruppe, die unter aeroben Bedingungen behandelt wurde (Borriello *et al.*, 2004). Bei Versuchen mit *P. aeruginosa* wurde festgestellt, dass Hypoxie das Membranpotenzial der äußeren Zellmembran herabsetzt und dadurch die Toleranz

gegenüber Antibiotika wie Aminoglykosiden erhöht, da diese zum Transport in die Zelle ein funktionierendes Membranpotenzial benötigen (Stewart, 2015). Gleichzeitig führt Hypoxie bei planktonischen *P.-aeruginosa*-Zellen zu einer Überexpression von Effluxpumpen in der Bakterienzellmembran (Schaible *et al.*, 2012), sodass dieser Effekt möglicherweise auch bei Subpopulationen im Biofilm eintritt, die in Bereichen mit geringer Sauerstoffsättigung leben (Tata *et al.*, 2016). Effluxpumpen transportieren antimikrobielle Substanzen aus der Bakterienzelle in den extrazellulären Raum und verhindern dadurch die intrazelluläre Wirkung (Poole, 2007).

Ein weiterer Mechanismus zum Schutz gegen die bakterizide Wirkung von Antibiotika ist die Anpassung der oxidativen Stressantwort von Bakterienzellen im Biofilm. Es wird davon ausgegangen, dass Antibiotika neben ihren bekannten Aktionsmechanismen auch eine Induktion letaler Level von ROS in den Bakterienzellen verursachen und ihre bakterizide Wirkung dadurch verstärken (Dwyer *et al.*, 2015). Bakterizide Antibiotika erhöhen die bakterielle Zellatmung (Lobritz *et al.*, 2015), wodurch die Eisen-Homöostase gestört und als Nebenprodukt hochreaktive Hydroxylradikale gebildet werden. Diese Hydroxylradikale tragen durch Oxidation lebenswichtiger Zellbestandteile (z. B. bakterielle DNA) zum Zelltod bei (Imlay, 2013).

P.-aeruginosa-Zellen im Biofilm reagieren – wie ihre planktonischen Gegenspieler – auf erhöhte intrazelluläre ROS-Level mit der Reduktion ihrer Viabilität (Jensen *et al.*, 2014). In Versuchen mit *P.-aeruginosa*-Biofilmen und Ciprofloxacin wurde eine erhöhte Produktion der Katalase KatA festgestellt, die die toxische Wirkung von ROS verminderte (Nguyen *et al.*, 2011). Die *Stringent Response*, ursprünglich bekannt als die Anpassung des bakteriellen Stoffwechsels an eine Unterversorgung mit Nährstoffen, hat hier wohl auch eine regulatorische Funktion. So konnte die Aktivierung der *Stringent Response* den durch ROS induzierten Schaden durch die Überexpression von antioxidativ wirkenden Enzymen wie Superoxid Dismutase, Katalase KatA und KatB verhindern (Khakimova *et al.*, 2013).

Bedeutung von Quorum Sensing

Als bedeutender Kommunikations-Mechanismus zwischen Bakterienzellen spielt QS auch in Bezug auf Antibiotika-Resistenzen eine wichtige Rolle. Bjarnsholt *et al.* fanden heraus, dass durch QS-Inhibition mit Furanon die Sensitivität von

P.-aeruginosa-Zellen gegenüber Tobramycin erhöht werden konnte (Bjarnsholt *et al.*, 2005). Durch die QS-Inhibitoren Cinnamaldehyd und Baicalinhydrat wurde die Resistenz gegenüber Tobramycin bei bereits bestehenden *P.-aeruginosa*-Biofilmen deutlich vermindert, ohne die Empfindlichkeit der planktonischen Zellen gegenüber Tobramycin zu beeinflussen (Brackman *et al.*, 2011). Erst kürzlich zeigten Chua *et al.*, dass auch die Entstehung von Colistin-toleranten Subpopulationen in *P.-aeruginosa*-Biofilmen QS-abhängig ist (Chua *et al.*, 2016).

Der genaue Mechanismus, wie QS die Antibiotika-Toleranz in Biofilmen fördert, war lange unklar. Hazan *et al.* postulierten für *P.-aeruginosa*-Biofilme eine mögliche Erklärung: durch das QS-regulierte Molekül HQNO (2-n-Heptyl-4-Hydroxyquinolon-N-Oxid) wird die bakterielle Atmungskette gehemmt, wodurch sich intrazellulär ROS ansammeln und das Membranpotenzial reduziert wird. Als direkte Folge kommt es in den betroffenen Zellen zur Autolyse und eDNA-Freisetzung. eDNA in der Biofilm-Matrix führt, wie bereits beschrieben, über verschiedene Mechanismen zu erhöhter Toleranz gegenüber Antibiotika (Hazan *et al.*, 2016).

In einer Studie von Skindersoe *et al.* mit *P.-aeruginosa*-Biofilmen wurde die Wirkung verschiedener Antibiotika auf das QS untersucht, wobei Azithromycin, Ceftazidime und Ciprofloxazin in subinhibitorischen Konzentration eine verminderte Produktion von QS-regulierten Virulenzfaktoren bewirkten (Skindersoe *et al.*, 2008).

Genetische Diversität der Zellen im Biofilm

Bakterienzellen im Biofilm sind durch ihre räumliche Nähe zueinander und durch ihren sesshaften Charakter optimal für den interzellulären Transfer genetischen Materials geeignet. Neben eDNA, die von kompetenten Zellen aus der Matrix aufgenommen werden kann, ist im Zuge des HGT auch die Konjugation von Plasmiden möglich (Hall & Mah, 2017). Dass die Konjugation von Plasmiden in Biofilmen deutlich effizienter ist, zeigten Savage *et al.* – die Konjugationsfrequenz eines Plasmids zur Multiresistenz von *S. aureus* war im Biofilm um den Faktor 10^4 höher als in planktonischen Kulturen (Savage *et al.*, 2013). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass durch die Aktivierung der *Stringent Response* im Biofilm die Expression von Integrase gesteigert wurde. Dadurch war die

Exzisionsfrequenz von Genkassetten zur Antibiotika-Resistenz über 100-mal höher als in planktonischen Zellen (Strugeon *et al.*, 2016).

Zusätzlich zu den verbesserten Bedingungen für HGT kommt die erhöhte Mutationsfrequenz in Biofilmen. Es wird angenommen, dass Zellen in Biofilmen häufig oxidativem Stress ausgesetzt und dadurch anfälliger für DNA-Schädigungen und Mutationen sind (Boles & Singh, 2008). Diese Hypothese konnte bei Versuchen mit *S. aureus* unterstützt werden: *S.-aureus*-Biofilme, die unter antioxidativen Bedingungen kultiviert wurden, hatten eine reduzierte Mutationsfrequenz, die mit der von planktonischen Zellen zu vergleichen war (Ryder *et al.*, 2012). Hypermutable *P.-aeruginosa*-Zellen, die häufig bei CF-Patienten isoliert werden, zeigen meist defekte DNA-Reparatur-Mechanismen, sodass in kürzester Zeit zahlreiche Mutationen entstehen und durch HGT verbreitet werden können (Oliver *et al.*, 2000, Mandsberg *et al.*, 2009). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Transkription von Enzymen zur ROS-Bekämpfung in *P.-aeruginosa*-Biofilmen herunterreguliert und dadurch die Fähigkeit zur Bekämpfung von oxidativem Stress verringert war. Dieser Mechanismus könnte zur erhöhten Mutationsfrequenz in Biofilmen beitragen (Driffield *et al.*, 2008).

Small Colony Variants und Persisterzellen in Biofilmen

Small Colony Variants (SCVs) sind Zellen einer Bakterien-Population, die trotz genetischer Übereinstimmung einen anderen Phänotyp ausbilden. Dieser beinhaltet unter anderem eine reduzierte Koloniegröße, langsames Wachstum, herabgesetztes Membranpotenzial und eine erhöhte Antibiotika-Resistenz. Es wird davon ausgegangen, dass chronische und rezidivierende Infektionen wie chronische Osteomyelitiden und Implantat-assoziierte Infektionen in Zusammenhang mit SCVs auftreten (Proctor *et al.*, 2006). Das Vorkommen von SCVs ist im Vergleich zu planktonischen Kulturen im Biofilm erhöht, gleichzeitig neigen SCVs zu vermehrter Biofilm-Bildung (Singh *et al.*, 2009).

Bei Versuchen mit *P. aeruginosa* wurde festgestellt, dass SCVs, die während einer Antibiotika-Behandlung gebildet wurden, zur Biofilm-Bildung neigten und sich nach Absetzen der Antibiotika zu ihrem ursprünglichen Phänotyp zurück entwickelten (Drenkard & Ausubel, 2002). Bei *P.-aeruginosa*-Zellen, in denen der Mechanismus zur Rückbildung aus SCVs verhindert wurde, wurden phänotypisch stabile SCVs gebildet, die ihre Toleranz gegenüber Antibiotika beibehielten. Die

Ausbildung von SCVs in *P.-aeruginosa*-Biofilmen scheint daher ein wichtiger Faktor der Biofilm-Widerstandsfähigkeit zu sein (Hall & Mah, 2017).

Eine ähnliche Rolle spielen Persisterzellen in bakteriellen Biofilmen – durch Toxin-Antitoxin-Mechanismen wird ein Teil der Population in einen schlafähnlichen Zustand versetzt, sodass Antibiotika, die in Stoffwechselprozesse eingreifen, nicht mehr wirken können (Lewis, 2008). So konnte durch Überexpression des YafQ-Toxins, das spezifisch für die Bildung von Persisterzellen in Biofilmen nötig ist, eine signifikant höhere Überlebensrate bei antibiotischer Behandlung bewirken (Harrison *et al.*, 2009). Van Acker *et al.* zeigten, dass die Transkription von Toxingenen bei *Burkholderia-cenocepacia*-Biofilmen im Vergleich zu ihren planktonischen Zellen gesteigert war. Durch diese Überexpression konnte das Überleben von Zellen im Biofilm unter der Behandlung mit Tobramycin und Ciprofloxacin gesteigert werden. Die Rolle von Toxinen in der Persisterzell-Bildung und die Bedeutung von Biofilm-Persisterzellen in der Toleranz gegenüber Antibiotika werden hier deutlich (Van Acker *et al.*, 2014).

Synergistische Effekte bei polymikrobiellen Biofilmen

Neben Biofilmen, die allein durch eine Bakterienspezies gebildet werden, kommen auch polymikrobielle Biofilme vor. Durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Spezies im Biofilm kann die Antibiotika-Toleranz der ganzen Gemeinschaft gesteigert werden. Da viele (Biofilm-assoziierte) Infektionen polymikrobiellen Ursprungs sind, wird angenommen, dass diese Wechselwirkungen auch im klinischen Kontext relevant sind (Elias & Banin, 2012, Wolcott *et al.*, 2013).

In einem *in-vivo*-Wundmodell mit *P. aeruginosa* konnte nachgewiesen werden, dass *P. aeruginosa* im polymikrobiellen Biofilm mit *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Finnegoldia magna* doppelt so widerstandsfähig gegenüber Gentamicin war, als im allein durch *P. aeruginosa* gebildeten Biofilm (Dalton *et al.*, 2011). In Versuchen mit Biofilmen von *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*) und *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) führte die Sekretion von Beta-Laktamase durch *M. catarrhalis* zur Amoxicillin-Resistenz bei *S. pneumoniae*. Im Gegenzug dazu konnte *S. pneumoniae* *M. catarrhalis* vor der Schädigung durch Azithromycin schützen (Perez *et al.*, 2014).

Interessanterweise konnten in Bezug auf Antibiotika-Toleranz auch synergistische Effekte bei polymikrobiellen Biofilmen zwischen Bakterien und Pilzen festgestellt werden. Es wird vermutet, dass durch die Ethanol-Produktion von *Candida albicans* die Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa* angeregt wird und diese polymikrobielle Population dadurch eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika entwickelt (Chen *et al.*, 2014).

2.4.3.4. Diagnostik und Therapie

Die klinische Mikrobiologie fokussiert sich überwiegend auf die Kultivierung und Untersuchung von planktonisch wachsenden Mikroorganismen, sodass mittlerweile ein breites Verständnis über die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Antiseptika herrscht. Diese Erkenntnisse können jedoch nur bedingt auf den jeweiligen Biofilm-Phänotyp übertragen werden. Bakterien, die im Biofilm wachsen, sind deutlich schwieriger aus klinischen Proben zu isolieren. Erfolgt die Antibiotika-Behandlung anhand von Resistenz-Tests für planktonische Mikroorganismen, führt das bei Infektionen durch mikrobielle Biofilme häufig zum Therapieversagen oder zum Wiederauftreten der Infektion (Hoiby *et al.*, 2015).

Diagnostik

Die Bakterienkultur stellt in der medizinischen Mikrobiologie den Gold-Standard der Diagnostik dar. Leider ist die Anzucht von Bakterien aus Biofilmen meist deutlich weniger erfolgreich, sodass die Aussagekraft der Kultur bei Biofilm-assoziierten Infektionen an Wert verliert. Zahlreiche Publikationen deuten darauf hin, dass zwischen Kultur und anderen molekularen Diagnostikmethoden wie der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) eine erhebliche Diskrepanz besteht (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Häufig macht die Art der Probennahme den entscheidenden Unterschied. Zellen im Biofilm sind durch die Matrix geschützt und dadurch meist fest an der Oberfläche haftend. Hall-Stoodley *et al.* gaben daher 2012 eine Empfehlung für die Probennahme bei Biofilm-assoziierten Infektionen heraus. Die Kombination aus Tupferproben, Proben von flüssigem (Entzündungs-) Material, Gewebeproben (Biopsien) und Proben von gegebenenfalls beteiligtem Fremdmaterial wie Wundnähten oder Wundauflagen soll die Fehlerquote reduzieren. Besonders Gewebeproben, die bestenfalls an verschiedenen Lokalisationen entnommen wurden, sind zusätzlich für eine histologische Untersuchung sinnvoll und der

Nachweis von Bakterien im umliegenden Gewebe wird ermöglicht. Des Weiteren können eingewanderte PMNs und Makrophagen am Ort der Entzündung beurteilt werden und einen weiteren Hinweis auf ein infektiöses Geschehen geben (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Chronische Wunden sind häufig sowohl mit Aerobiern als auch mit Anaerobiern infiziert. Während aerobe Bakterien an der Wundoberfläche isoliert werden können, befinden sich anaerobe Bakterien tiefer im Gewebe und sind dementsprechend schwieriger zu beproben (James *et al.*, 2008). Für die erfolgreiche Diagnostik von chronischen Wunden sind daher gründliche, tiefreichende Tupferproben und Biopsien dringend erforderlich (Davies *et al.*, 2007).

Neben der erschwerten Probennahme stellt die erfolgreiche Anzüchtung von Bakterien aus einem Biofilm eine Herausforderung dar. So können die komplexen Umgebungen *in vivo* häufig nur schwer imitiert werden, und abweichende Sauerstoff- und Nährstoff-Konzentrationen sowie zu kurze Inkubationszeiten führen zu falsch negativen Ergebnissen (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Lebende, aber nicht-kultivierbare Bakterienzellen (*viable but nonculturable*) können so erst durch molekulare Analysen identifiziert werden (Percival *et al.*, 2012).

Im klinischen Kontext ist die Wahrscheinlichkeit einer vorausgegangenen Antibiotika-Behandlung außerdem hoch, sodass planktonische, leicht kultivierbare Bakterienzellen bereits abgetötet wurden. Durch die Vorbehandlung von infizierten Gelenksprothesen in einem Ultraschall-Bad („*Sonication*“) und anschließender Kultivierung der Flüssigkeit konnte die Sensitivität signifikant erhöht werden (Trampuz *et al.*, 2007). Es wird davon ausgegangen, dass die Biofilmstruktur durch Ultraschallwellen aufgebrochen und Bakterien aus der Matrix freigesetzt werden. Dadurch können die Bakterien in ihren planktonischen Phänotyp konvertiert und erfolgreicher kultiviert werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Karbysheva *et al.* zeigten kürzlich, dass durch die Behandlung mit Ultraschall die Biofilmstruktur bei *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgreich zerstört werden konnte (Karbysheva *et al.*, 2020).

Weitere, die Bakterienkultur ergänzende Diagnostikmethoden sind PCR und FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Durch die hohe Sensitivität der PCR kann auch eine geringe Anzahl an Bakterien nachgewiesen werden. FISH bietet die Möglichkeit des spezifischen *in-situ*-Nachweises von Mikroorganismen im

Gewebe sowie die räumliche Darstellung von Bakterienaggregaten und den umliegenden Zelltypen. Durch Hybridisierung eines durch Fluoreszenz markierten, spezifischen Markers an die ribosomale RNA können Bakterien identifiziert und sichtbar gemacht werden. In Kombination mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) kann so erkannt werden, ob beteiligte Bakterien in Aggregaten vorliegen, ob es sich um einen polymikrobiellen Biofilm handelt und welches Ausmaß der Biofilm auf der Oberfläche annimmt. Gleichzeitig wird Biofilm-EPS sichtbar, die meist einen größeren Anteil des Biofilms ausmacht als die Bakterien selbst (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Electron Spray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) kombiniert universelle Primer (z. B. 16S rRNA Gene) mit Genera- und Spezies-spezifischen Haushalts- oder Antibiotika-Resistenz-Genen, um Nukleinsäure-Sequenzen in der Probe zu amplifizieren, ohne vorher die Spezies zu kennen. Durch mikrobielle Signaturen können bakterielle und fungale Pathogene so bis zum Spezies-Level identifiziert werden. Im Vergleich zum Kulturnachweis ist diese Methode weitaus zeitsparender und ermöglicht die Identifizierung eines Pathogens in einem Schritt auf Spezies-Level. Zur Validierung können im Anschluss *in-situ*-Methoden wie FISH und CLSM angewendet werden, um mikrobielle Aggregate nachzuweisen (Costerton *et al.*, 2011, Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Phylogenetische Sequenzierung ist ein weiterer Ansatz mit hoher Durchsatzleistung für den Nachweis von Bakterien ohne Kultur oder PCR. Bakterielle Gemeinschaften in Umwelt, Tier und Mensch konnten so charakterisiert werden. So ergab die Sequenzierung von bakteriellen Populationen in chronischen Wunden eine deutlich größere Diversität als durch kulturellen Nachweis (Dowd *et al.*, 2008, Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Auch serologisch basierte Untersuchungen wie der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) werden in der Biofilm-Diagnostik angewendet. In CF-Patienten mit Beteiligung von *P. aeruginosa*-Biofilm können Antikörper sowohl gegen *P. aeruginosa* selbst als auch gegen spezifische, von *P. aeruginosa* produzierte Toxine wie Elastase, alkalische Protease, Exotoxin A und Alginat eingesetzt werden (Pressler *et al.*, 2009).

Zur erfolgreichen Diagnostik von Infektionen, die möglicherweise im Zusammenhang mit Biofilmen stehen, müssen neben der klassischen Kultivierung

demnach weitere Diagnostikmethoden angewendet werden. Nicht alle Biofilm-assoziierten Infektionen sind Kultur-negativ – aber durch häufig falsch-negative Ergebnisse kann eine infektiöse Ätiologie nach negativer Kultivierung nicht ausgeschlossen werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Die *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* veröffentlichte 2014 eine Richtlinie für Diagnose und Behandlung von Biofilm-assoziierten Infektionen. Anhand von konkreten Empfehlungen für den Umgang mit typischen Biofilm-assoziierten Infektionen wurde hier ein praxisnaher Leitfaden geschaffen (Hoiby *et al.*, 2015).

Therapie

Die Wirksamkeit von Antibiotika ist aufgrund der zahlreichen Resistenz- und Toleranz-Mechanismen von Bakterien im Biofilm deutlich eingeschränkt. Die Ansprechbarkeit von Bakterien auf Antibiotika wird in der Regel an planktonischen Populationen getestet, sodass diese nicht der tatsächlichen Wirksamkeit bei Bakterien im Biofilm entspricht (Smith *et al.*, 2003). Müsken *et al.* betonen daher die Bedeutung der individuellen Untersuchung der Wirksamkeit von Antibiotika auf Biofilme. Am Beispiel von CF-Patienten werden Biofilm-Proben aus Sputum isoliert und deren Ansprechbarkeit auf Aztreonam, Colistin und Tobramycin untersucht. Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um die Antibiotika-Resistenz von *P. aeruginosa* unter Biofilm-Bedingungen zu ermitteln und gemäß dem *Biofilm-Active-Score* einzustufen. Dieser beschreibt die Empfindlichkeit des Biofilms gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum und wird mittels lebend-tot-Färbung und CLSM eingestuft (Müsken *et al.*, 2017). Foweraker *et al.* machen außerdem deutlich, dass verschiedene Kolonien desselben Morphotyps von *P. aeruginosa* aus CF-Sputum unterschiedliche Ergebnisse in der Antibiotika-Sensitivität aufweisen können (Foweraker *et al.*, 2005).

In Kanada wird bereits ein *Biofilm Antimicrobial Susceptibility Panel*, genannt BioFILM PATM (Innovotech Inc) genutzt, das kommerziell erhältlich und von *Health Canada* für *P. aeruginosa* lizenziert wurde (Waters & Ratjen, 2015).

Jüngere Biofilme sind generell empfindlicher gegenüber Antibiotika als ältere und ausgereifere Biofilme. Daher spielt die Entwicklung von Techniken zur frühzeitigen Erkennung eine wichtige Rolle, sodass Behandlung und Entfernung des Biofilms erfolgreicher werden (Donlan & Costerton, 2002).

Da die alleinige Anwendung von Antibiotika in üblichen Dosierungen meist nur unzureichende Ergebnisse in der Bekämpfung von Bakterien im Biofilm liefert, sind Methoden zur Hemmung der Biofilm-Bildung und zur Auflösung des bestehenden Biofilms von großer Bedeutung. Nachdem die Biofilm-Matrix aufgebrochen ist und Bakterienzellen zugänglich sind, kann die antibiotische Behandlung mit besseren Erfolgchancen durchgeführt werden.

Die Hemmung des QS ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Unterdrückung der Biofilm-Bildung. Furanone können, durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu dem QS-Signalmolekül AHL kompetitiv an den AHL-Rezeptor binden und dessen Wirkung schmälern. So kann durch die Behandlung mit Furanonen die Oberflächen-Aggregation der Bakterienzellen gehemmt werden (Givskov *et al.*, 1996). Furanon 56 beeinflusst die Expression von QS-relevanten Genen bei *P. aeruginosa*, sodass die Biofilm-Struktur verändert und die Ablösung von Zellen aus dem Biofilm gefördert wird (Hentzer *et al.*, 2002). Quercetin, ein Flavonoid, beeinflusst das QS von *S. aureus* und hemmt so konzentrationsabhängig die Alginat-Produktion. Durch die Reduktion der EPS-Produktion wird die initiale Anhaftung während der Biofilm-Bildung erschwert (Lee *et al.*, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass eine Resistenz gegenüber QS-Inhibitoren nur durch Mutationen auftritt, die Bakterien unfähig für QS und die Produktion von Virulenzfaktoren macht. Sollte sich diese Annahme bewahrheiten, hätte die Entwicklung von Resistenzen gegenüber QS-Inhibitoren keine klinische Konsequenz (Hoiby *et al.*, 2010). Da das QS auch für Mechanismen zur Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Immunsystem wichtig ist, kann durch QS-Inhibition auch die Empfindlichkeit gegenüber dem Immunsystem erhöht werden. So zeigten *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuche, dass die schwache Wirkung von Antibiotika und PMNs auf *P. aeruginosa*-Biofilme durch QS-Inhibitoren verstärkt werden konnte (Jensen *et al.*, 2007, Brackman *et al.*, 2011).

Die Aktivierung der *Stringent Response* ist ein wichtiger Mechanismus für Bakterien im Biofilm, um unter nährstoffarmen Umweltbedingungen und während antibiotischen Behandlungen das Überleben der Bakterien-Population zu sichern. Zur Aktivierung werden intrazelluläre Signalmoleküle, sogenannte Alarmone synthetisiert, die bei Akkumulation im Biofilm eine erhöhte Antibiotika-Toleranz und eine veränderte Virulenz der Bakterienzellen bewirken (Abranches *et al.*, 2009). Durch das 1018-Peptid kann die Alarmon-Akkumulation gehemmt, die

Biofilm-Bildung gestört und schon bestehender Biofilm zerstört werden (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2014). Auch das Peptid 1037 war in der Lage, Biofilme von vielen grampositiven und gramnegativen Bakterien zu reduzieren (de la Fuente-Núñez *et al.*, 2012).

Die EPS trägt wesentlich zum Schutz der Bakterien im Biofilm bei. Durch die Auflösung der EPS sind die Bakterienzellen den antibiotischen Wirkstoffen direkt ausgesetzt. Enzyme wie Polysaccharid-Lyasen (Dispersin B) und DNAsen (DNase I) können Exopolysaccharide spalten (Stewart, 2015). DNase I schneidet eDNA in der Matrix, Dispersin B spaltet Polymere von PNAG und erschwert so die Aggregation von Bakterien. Dispersin B ist außerdem in der Lage, EPS-Schichten auf medizinischen Geräten aufzulösen (Kaplan, 2009). In Kombination mit Antibiotika sind diese Enzyme wirksame Substanzen, um Bakterien im Biofilm abzutöten (Darouiche *et al.*, 2009). Die Spaltung des Matrixbestandteils Alginat bei *P.-aeruginosa*-Biofilmen führt ebenfalls zu besserer Antibiotika-Wirksamkeit. Hatch und Schiller konnten zeigen, dass durch Alginat-Lyase eine effektivere Diffusion von Gentamicin und Tobramycin in den Biofilm erreicht werden konnte (Hatch & Schiller, 1998).

Die Ablösung von Teilen des Biofilms ist ein physiologischer Schritt in der Verbreitung und Vermehrung der Bakterien im Biofilm. Die Regulation dieser partiellen Auflösung der EPS erfolgt bei vielen Bakterien über den *Second Messenger cyclic di-GMP*. Hohe Level an *cyclic di-GMP* fördern EPS-Synthese und Biofilm-Formation, niedrige Level führen zum Auflösen der Matrix und der Freisetzung von Zellen (Römling *et al.*, 2013). Durch die Inhibition der *Diguanylat-Cyclase*, die für die Synthese von *cyclic di-GMP* verantwortlich ist, kann die Biofilm-Bildung verhindert werden (Sambanthamoorthy *et al.*, 2012). Zusätzlich kann der Abbau von *cyclic di-GMP* durch spezifische Phosphodiesterasen (PDE) gefördert werden. Barraud *et al.* zeigten, dass durch Nitritoxid die Aktivität der PDE stimuliert und die Auflösung des Biofilms gefördert werden konnte (Barraud *et al.*, 2009).

Acyldepsipeptide (ADEP) gehören einer Klasse von Antibiotika an, die durch eine unkontrollierte Steigerung der proteolytischen Aktivität in Bakterienzellen die Zellteilung verhindern und den Zelltod auslösen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Durch die Aktivierung der ClpP-Protease in *S. aureus* mit ADEP 4 konnten Persisterzellen der Population eliminiert werden. In Kombination mit Rifampicin

wurden Persisterzellen, Zellen in der stationären Wachstumsphase und *S.-aureus*-Biofilm-Populationen beseitigt (Conlon *et al.*, 2013). Mitomycin C (MMC), ein Chemotherapeutikum, zeigt sich ebenfalls wirksam gegenüber Persisterzellen im Biofilm. MMC wird passiv durch die Zellmembran transportiert und in der Zelle aktiviert, woraufhin es zu einer Vernetzung der bakteriellen DNA kommt. Kwan *et al.* konnten nachweisen, dass MMC dadurch sowohl Stoffwechsel-aktive als auch Stoffwechsel-inaktive Zellen eliminiert und daher ein potentes Bakterizid in der Behandlung von *E. coli*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* darstellt (Kwan *et al.*, 2015).

Ein weiterer Ansatz, die Bildung und Persistenz von Biofilmen im Körper zu bekämpfen, ist die Entwicklung von Biofilm-spezifischen Impfstoffen. Bakterien im Biofilm entwickeln einen eigenen Phänotyp, der sich von dem ihrer planktonischen Partner unterscheidet. So werden bestimmte Antigene im Biofilm überexprimiert. Bei Studien mit *S. aureus* konnten einige Antigene identifiziert werden, die sich als potenzielle Angriffspunkte für Impfstoffe eignen könnten. Alt, das primäre Autolysin von *S. aureus*, wird unter Biofilm-Bedingungen übersynthetisiert. Eine Impfung gegen Alt könnte möglicherweise die Anhaftung und Biofilm-Bildung von *S. aureus* verhindern. Ebenso wird Lipase im Biofilm von *S. aureus* übersynthetisiert und könnte aufgrund ihrer ausgeprägten Immunogenität ein weiterer Ansatz zur Impfstoffentwicklung sein (Brady *et al.*, 2006).

Raafat *et al.* beschäftigten sich kürzlich mit der Bekämpfung von *S.-aureus*-Biofilmen durch monoklonale Antikörper. Bei *in-vitro*-Versuchen konnte die Biofilm-Bildung in verschiedenen Stadien gehemmt werden: Durch Bindung an Adhäsine konnte die initiale Anhaftung reduziert werden, die Inaktivierung von Oberflächenproteinen zur interzellulären Bindung beeinflusste die Integrität des Biofilms und mittels Antikörpern gegen stabilisierende Matrixproteine wurde die Abspaltung von Teilen des Biofilms gefördert. Antikörper gegen Virulenzfaktoren konnten diese neutralisieren und durch Bindung an die Oberfläche des Biofilms die Eliminierung durch PMNs und Makrophagen fördern. In klinischen Studien konnten bisher jedoch keine Verbesserung der Behandlungsergebnisse durch die Anwendung von Biofilm-spezifischen Antikörpern erzielt werden. Die Entwicklung von multivalenten Impfstoffen mit mehreren, möglichst Biofilm-assoziierten Angriffspunkten könnte in Zukunft dennoch einen erfolgsversprechenden Therapieansatz bei der Behandlung von Biofilm-assoziierten Infektionen darstellen (Raafat *et al.*, 2019).

Trotz intensiver Forschung in Richtung medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten ist die mechanische Entfernung des Biofilms häufig der einzige anhaltend erfolgsversprechende Therapieansatz. Chronische Wunden, die überwiegend mit bakterieller Biofilm-Bildung in Zusammenhang gebracht werden, haben lediglich nach Entfernung von infiziertem, nekrotischem Gewebe und Schorf eine Chance auf Heilung (Dowsett, 2013). Nach Keast *et al.* ist die beste Behandlungs-Strategie bei Wunden mit Biofilm-Beteiligung das adäquate Wund-Débridement mit anschließender Abdeckung mit antimikrobiellen Wundauflagen, um die verbleibenden, planktonischen Bakterien an erneuter Biofilm-Bildung zu hindern (Keast *et al.*, 2014). Biofilme, die nach Débridement erneut gebildet werden, sind 24-48 Stunden nach dieser Entfernung empfänglicher gegenüber Antibiotika-Behandlungen, sodass ein wiederholtes Débridement sinnvoll sein kann (Wolcott *et al.*, 2010). Die *World Union of Wound Healing Societies* brachten 2016 eine Empfehlung zum Management von Biofilm bei der Wundheilung heraus. Auch hier wird auf die Bedeutung der Biofilm-Reduktion durch Wund-Débridement und intensiver Reinigung hingewiesen. Kommt es trotz anschließender Behandlung mit Wundauflagen und topischen Antibiotika, um eine Rekontamination zu verhindern und die Biofilm-Reformation zu unterdrücken, erneut zur Biofilm-Bildung, muss dieser Vorgang wiederholt werden (Malone *et al.*, 2016).

In den letzten Jahren hat sich außerdem die Anwendung von Niederfrequenz-Ultraschall (*low-frequency ultrasound*, LFU) bei der Behandlung von chronischen Wunden etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von Gentamicin gegenüber *P.-aeruginosa*-Biofilmen nach der Anwendung von LFU verbessert werden konnte (Cai *et al.*, 2017). Dabei scheint LFU den Transport von Gentamicin in den Biofilm zu fördern. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Untersuchungen mit *E.-coli*-Biofilmen erzielt (Carmen *et al.*, 2004). Die regelmäßige Anwendung von LFU in Kombination mit topischen Antibiotika bei Wunden mit *P.-aeruginosa*-Biofilmen führte zu einer signifikanten Reduktion lebender Bakterienzellen. Außerdem konnte ein besseres Zusammenspiel von Entzündungsreaktion und Wundheilung beobachtet werden (Seth *et al.*, 2013).

Beim Management von Parodontitis steht die mechanische Entfernung des Biofilms an erster Stelle. Erst nach Entfernung der mikrobiellen Plaques und des infizierten Gewebes besteht die Chance auf Abklingen des Entzündungsgeschehens und

Heilung. Ist eine medikamentöse Behandlung mit Antibiotika und / oder immunmodulierenden Substanzen nötig, erfolgt diese erst im Anschluss. Für anhaltenden Erfolg in der Behandlung von chronischer Parodontitis ist eine lebenslange gute Mundhygiene wichtig, bei der sich neu bildender Biofilm regelmäßig und effektiv entfernt wird (Kinane *et al.*, 2017).

Die Behandlung von CF-Patienten mit *P.-aeruginosa*-Infektionen setzt sich in den meisten CF-Behandlungszentren aus einer Kombination von suppressiver Antibiotikatherapie und schleimlösender Therapie mit DNase zusammen (Høiby *et al.*, 2011). Zur Prävention chronischer Infektionen wird bei intermittierender Kolonisation die frühzeitige und aggressive Inhalationstherapie mit Colistin, Ciprofloxacin oder Tobramycin über wenige Wochen empfohlen (Döring & Hoiby, 2004). Besteht bereits eine chronische *P.-aeruginosa*-Infektion, ist eine lebenslange tägliche, suppressive Antibiotika-Therapie nötig. Dabei wird die tägliche Inhalationstherapie mit Colistin oder Tobramycin mit regelmäßigen Zyklen intravenöser Antibiotika-Therapie kombiniert (Döring *et al.*, 2000). Durch die tägliche Inhalation von DNase wird *P.-aeruginosa*-Biofilm aufgelockert und die Viskosität des Sputums reduziert, sodass dieser leichter abgehustet werden kann (Frederiksen *et al.*, 2006). Ziel der suppressiven Antibiotika-Therapie ist, die Abstände zwischen den Phasen klinischer Verschlechterung zu verlängern und die Abnahme der Lungenfunktion hinauszuzögern (Høiby *et al.*, 2011).

Infektionen von Medizinprodukten wie Implantaten, die auf bakterielle Biofilm-Bildung zurückzuführen sind, werden nach einem ähnlichen Prinzip behandelt. Als erster Schritt wird immer die Vorbeugung initialer Kontamination gesehen. Kommt es zur Kontamination, sollte die mikrobielle Anhaftung an das Produkt minimiert werden. Wird ein Biofilm gebildet, müssen die Biofilm-Matrix penetriert und Biofilm-assoziierte Zellen eliminiert werden. Die Entfernung des Implantats stellt den letzten Schritt in der Behandlung Biofilm-assoziiierter Implantat-Infektionen dar (Donlan & Costerton, 2002).

Es gibt diverse Ansätze zur Prävention bakterieller Anhaftung und Biofilm-Bildung auf Implantaten und temporär implantierten Medizinprodukten. Dabei kommen vor allem antimikrobielle Beschichtungen auf Venenverweil- und Blasenkatetern zum Einsatz (Donlan & Costerton, 2002).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diverse Biofilm-assoziierte Infektionen nach einem einheitlichen Schema therapiert werden. Hat sich bereits ausgereifter Biofilm und dadurch die typische Pathogenese entwickelt, so muss als ursächliche Therapie der Biofilm entfernt werden. Im Anschluss kann eine medikamentöse Therapie erfolgen. Lässt die Lokalisation des Biofilms keine mechanische oder chirurgische Entfernung zu, werden Substanzen zur enzymatischen Auflockerung des Biofilms angewendet und mit intensiver antibiotischer Therapie kombiniert. Diese konservative Methode bringt meist jedoch nur eine Verbesserung der Symptomatik und führt nur in seltenen Fällen zur Heilung (Donlan & Costerton, 2002, Høiby *et al.*, 2011, Keast *et al.*, 2014, Kinane *et al.*, 2017).

3. Leptospiren

3.1. Taxonomie, Morphologie, Epidemiologie

Leptospiren gehören zur Familie der *Leptospiraceae* des Bakterien-Stamms der *Spirochaetales*. Sie beinhalten sowohl saprophytische als auch pathogene Spezies. Anhand von DNA-Homologien werden Leptospiren in 20 Spezies eingeteilt, die sich durch spezifische Oberflächenantigene in mehrere Serogruppen einteilen lassen, die wiederum verschiedene Serovare beinhalten. Die Leptospirenspezies werden in neun pathogene, sechs saprophytische und fünf sogenannte intermediäre Spezies aufgeteilt, deren Virulenz noch nicht experimentell nachgewiesen wurde (Picardeau, 2013). Von den pathogenen Leptospirenspezies stellt *Leptospira interrogans* eine der größten und verbreitetsten Gruppen dar (OIE, 2018).

Leptospiren sind gramnegative, schraubenförmige Bakterien, die sich durch ihre charakteristische Hakenform von anderen Spirochaeten unterscheiden. Sie können sich durch rotierende Bewegungen in flüssigen Medien fortbewegen und Gewebe penetrieren (Goldstein & Charon, 1988). Ihr Zellkörper besteht aus einem schraubenförmigen, protoplasmatischen Zylinder, zwei periplasmatischen Endoflagellen und einer Membranhülle, die mit zahlreichen Oberflächenproteinen versehen ist (Goldstein & Charon, 1988, Vieira *et al.*, 2014).

Pathogene Leptospiren sind in der Lage, in den Nierentubuli von Nagetieren zu persistieren. Sie werden über den Urin ausgeschieden und infizieren Menschen und andere Säugetiere über kleine Hautwunden oder Schleimhäute, die mit

kontaminiertem Wasser in Berührung kommen (McBride *et al.*, 2005). Nach hämatogener Verbreitung im Wirtsorganismus gelangen die Leptospiren in sämtliche Organe, wo sie – je nach Empfänglichkeit des Wirtes und Virulenz des Erregers – Organschäden verursachen (Haake & Levett, 2015).

3.2. Leptospirose

Die Leptospirose des Menschen ist eine weltweit verbreitete und potenziell tödliche Zoonose, die in vielen tropischen Regionen endemisch ist. Die Infektion erfolgt durch direkten oder indirekten Kontakt mit Reservoir-Wirten, die pathogene Leptospiren über den Urin ausscheiden. Die meisten humanen Leptospiren-Infektionen in endemischen Gebieten verlaufen mild oder asymptomatisch, wobei die Entwicklung von schwereren Verläufen von folgenden Faktoren abhängt: von den epidemiologischen Bedingungen, der Empfänglichkeit des Wirtes, der Serovar und der Virulenz des Pathogens. Die Symptome der Leptospirose sind meist unspezifisch (Fieber, Myalgie, Kopfschmerzen) im Sinne einer akuten, febrilen Erkrankung. Bei schweren Verläufen kommt es zu einer breiten hämatogenen Streuung der Pathogene, die zum Multiorganversagen führen kann. Dabei können Schäden der Leber, hämorrhagische Veränderungen der Lunge und Dysfunktionen der Nieren bis zum Nierenversagen verursacht werden. Während der Rekonvaleszenz kommt es häufig zu Leptospiren-bedingter Uveitis. Diese kann einmalig oder rezidivierend auftreten (Haake & Levett, 2015).

Die Leptospirose der Tiere ist allgegenwärtig – sie wurde bereits bei zahlreichen Tierspezies entdeckt. Das Pferd scheint unter den domestizierten Tieren besonders empfänglich für eine Leptospiren-Infektion zu sein, während eine Infektion bei Katzen selten vorkommt. Nach der Infektion, die meist über den Kontakt zu Schleimhäuten auftritt, folgt eine Phase der Bakteriämie, die mit klinischen Symptomen einhergehen kann, beim Pferd jedoch meist subklinisch verläuft. Während dieser Zeit können Leptospiren aus dem Blut und den meisten Organen isoliert werden. Durch das Auftreten von Leptospiren-Antikörpern endet die Bakteriämie und die Leptospiren verbleiben in den proximalen Nierentubuli, wo sie sich vermehren und über den Urin ausgeschieden werden (Ellis, 2015).

Leptospiren sind außerdem in der Lage, in Eileiter, Uterus und dem männlichen Genitaltrakt zu persistieren (Ellis, 2015). Die Fähigkeit zur Persistenz im Auge

mancher Spezies – insbesondere im Auge des Pferdes – kann zu Uveitis und Erblindung führen (Hartskeerl *et al.*, 2004).

Untersuchungen zur Seroprävalenz beim Pferd weisen darauf hin, dass das Pferd für eine Vielzahl von Leptospiren-Infektionen empfänglich ist. Insbesondere Infektionen durch Serovare der Serogruppen Pomona und Grippotyphosa, aber auch Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Sejroe, Canicola und Ballum konnten nachgewiesen werden. (Verma *et al.*, 2013, Ellis, 2015).

Um den Durchseuchungsgrad der Kleinsäugerpopulation in Deutschland festzustellen, untersuchten Cibulski *et al.* 299 Kleinsäuger aus Pferdestallungen auf das Vorhandensein von DNA pathogener Leptospiren. Außerdem wurden 87 Wasserproben aus stehenden Gewässern und Tränkebecken auf Leptospiren-DNA untersucht. Bei 14 % der untersuchten Kleinsäuger und 10 % der Wasserproben war DNA pathogener Leptospiren durch PCR nachweisbar (Cibulski, 2016, Cibulski & Wollanke, 2016).

Nach initialer Infektion können Pferde periodische Augenentzündungen entwickeln. Dabei kann die Inkubationszeit zwischen Infektion und erstem Auftreten von Uveitis-Symptomen stark variieren, beschrieben werden Monate bis Jahre (Williams *et al.*, 1971, Ellis, 2015). Sie gehen einher mit dem Auftreten spezifischer Antikörper im Augeninneren und der Persistenz von Leptospiren im Auge (Ellis, 2015).

3.3. Leptospiren-Wirt-Wechselwirkungen

Die Wechselwirkungen zwischen Leptospiren und dem Wirtsorganismus wurden in den letzten Jahren intensiv erforscht, sodass einige Mechanismen zur Bindung an Wirtsgewebe und der Modulation des Immunsystems durch *in-vitro*-Studien nachgewiesen werden konnten (Murray, 2015).

Die Bindung an Oberflächen des Wirtsgewebes ist ein wichtiger Schritt in der bakteriellen Pathogenese (Kline *et al.*, 2009). Durch *in-vitro*-Studien konnte die Bindung von Leptospiren an verschiedene Wirtszellen nachgewiesen werden, wobei die Bindungskapazität mit der Virulenz des Erregers korrelierte (Tsuchimoto *et al.*, 1984, Murray, 2015).

Leptospiren sind dabei in der Lage, an Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) zu binden. Hierzu gehören Glykosaminoglykane, Faserproteine, Kollagen,

Laminin, Fibronectin und Proteoglykane (Murray, 2015). Schon 1987 konnte nachgewiesen werden, dass pathogene Leptospiren an EZM-Bestandteile wie Fibronectin, Kollagen, Laminin und Hyaluronsäure binden können (Ito & Yanagawa, 1987). Seitdem wurde eine Vielzahl an Oberflächenproteinen und deren Bindungskapazität an EZM-Bestandteile nachgewiesen (Murray, 2015).

Proteine zur Bindung an Fibronectin, Laminin und Elastin ermöglichen die Invasion ins Gewebe und die Penetration von Gewebeschichten. Auch die Anhaftung an das Blutgefäßendothel wird erleichtert, woraus Gefäßschäden und hämorrhagische Veränderungen der Lunge resultieren können (Murray, 2015).

Ein weiterer Pathogenitätsmechanismus der Leptospiren ist die Beeinflussung der Hämostase und der Wundheilung. Die Bindung von Fibrinogen verhindert die Bildung von Fibrin, wodurch die Hämostase gestört wird und Blutungen auftreten (Oliveira *et al.*, 2013). Leptospiren sind außerdem in der Lage, durch die Bindung von Plasminogen dieses zu Plasmin zu aktivieren. Aktives Plasmin wirkt als Protease und kann Fibringerinnsel und EZM-Proteine spalten und Matrix-Metalloproteasen aktivieren. Die Bindung von Plasminogen durch Leptospiren kann so zur Gewebeschädigung beitragen, die wiederum die Streuung der Leptospiren im Wirt über Gewebegrenzen hinaus erleichtert (Oliveira *et al.*, 2013, Vieira *et al.*, 2013, Murray, 2015).

Leptospirengeladenes Plasmin beeinflusst darüber hinaus die Anlagerung von Immunglobulinen und des Komplementfaktors C3b, wodurch die Komplementaktivierung gestört und die Opsonisierung durch Phagozyten eingeschränkt wird. Leptospiren können so an den Ort des Infektionsgeschehens wandern, ohne durch das angeborene Immunsystem erkannt zu werden (Vieira *et al.*, 2011).

3.4. Biofilm-Bildung

Ristow *et al.* untersuchten 2008 erstmals die Fähigkeit der Leptospiren zur Biofilm-Bildung. Bei 90 % der insgesamt 30 Bakterienstämme aus sieben Leptospirenspezies konnte eine *in-vitro*-Biofilm-Bildung nachgewiesen werden. Dabei wurden *L. biflexa* (saprophytisch) und *L. interrogans* (pathogen) genauer untersucht. Die Biofilm-Bildung von *L. biflexa* war bei verschiedenen Inkubationstemperaturen gleichbleibend (21, 30, 37 °C), während *L. interrogans* nur bei 30 und 37 °C Biofilm bildete. Generell erfolgte die Biofilm-Bildung bei

saprophytischen Leptospiren früher (nach zwei bis fünf Tagen) als bei pathogenen Leptospiren (im Durchschnitt nach 20 Tagen) (Ristow *et al.*, 2008).

Wie bei anderen Biofilm-bildenden Bakterien erfolgte die Entwicklung des Biofilms von *L. biflexa* nach dem bekannten Muster: Anhaftung von planktonischen Zellen an eine Oberfläche, EPS-Bildung und Reifung des Biofilms sowie im Anschluss komplette oder teilweise Auflösung des Biofilms (Ristow *et al.*, 2008). Abbildung 5 zeigt Leptospiren-Biofilm, der auf einer Glasoberfläche gebildet wurde.

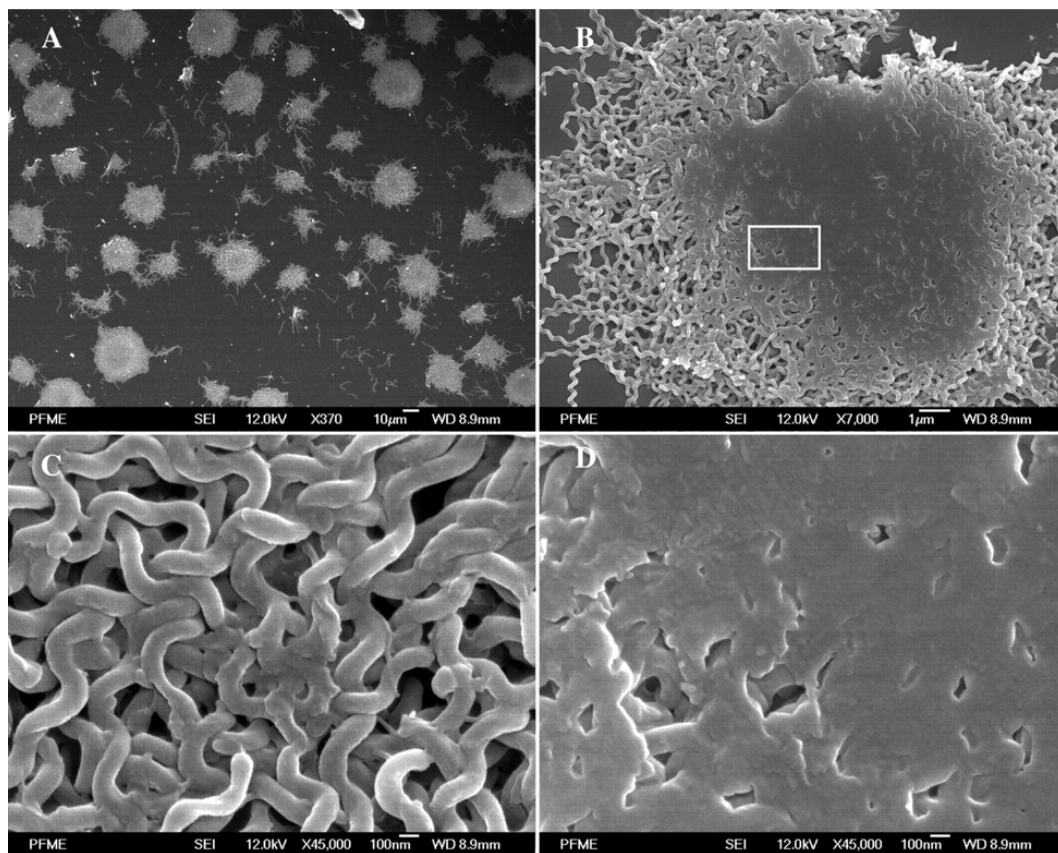


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von *L.-interrogans*-Biofilm auf einer Glasoberfläche

Zellaggregate von Leptospiren erscheinen als kugelförmige Strukturen, die in eine Biofilm-Matrix eingebettet sind. (Ristow *et al.*, 2008)

Leptospiren-Biofilme erschienen als multizelluläre und vielschichtige Strukturen, in denen Bakterienzellen durch kanalähnliche Hohlräume zur Nährstoffversorgung verbunden waren (siehe Abbildung 5). Die Zusammensetzung der Matrix ist bisher noch nicht bekannt, genetische Studien weisen aber darauf hin, dass *L. biflexa* und *L. interrogans* zur Biosynthese von Alginat fähig sind (Ristow *et al.*, 2008).

Vinod Kumar *et al.* konnten Leptospiren-DNA in natürlich vorkommenden Biofilmen in aquatischen Systemen nachweisen. Dabei wurden unter anderem Biofilme auf Reisblättern analysiert, die aus Reisanbaugebieten stammten. Obwohl durch Rasterelektronen-Mikroskopie keine Leptospiren-ähnlichen Strukturen im Biofilm nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 6), war die Beteiligung von pathogenen Leptospiren durch molekulargenetische Untersuchungen eindeutig festzustellen. Die Bildung von Biofilm an Oberflächen in aquatischen Systemen scheint als Persistenz-Mechanismus genutzt zu werden, um das Überleben und die Verbreitung von pathogenen Leptospiren in der Umwelt zu ermöglichen (Vinod Kumar *et al.*, 2016).

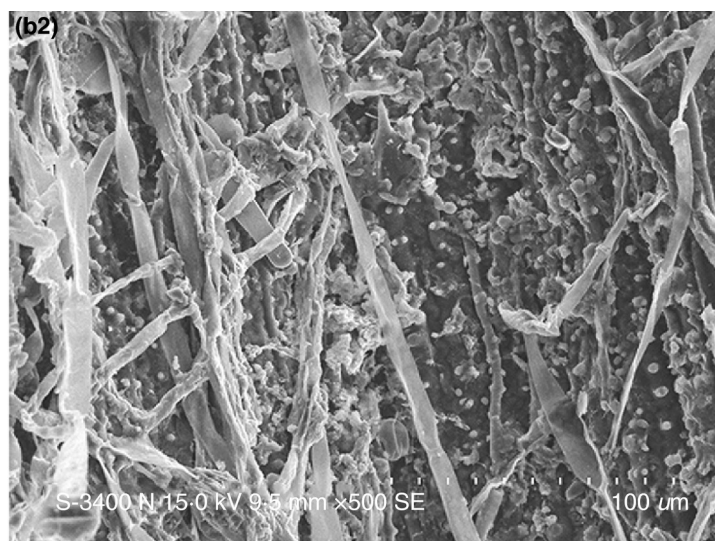


Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Biofilm auf der Oberfläche eines Reisblatts

Obwohl keine Leptospiren-ähnlichen Strukturen erkennbar sind (möglicherweise nicht ausreichende Vergrößerung), konnte die Beteiligung von pathogenen Leptospiren bei der Biofilm-Bildung auf Reisblättern durch molekulargenetische Untersuchungen eindeutig nachgewiesen werden. (Vinod Kumar *et al.*, 2016)

Es wird vermutet, dass Leptospiren auch in der Lage sind, *in vivo* Biofilme zu bilden (Ristow *et al.*, 2008, Brihuega *et al.*, 2012). Sowohl in Hinblick auf die Kolonisation der Nieren asymptomatischer Carrier als auch bei chronischen Nephritiden wird die Beteiligung von Biofilm vermutet (Ristow *et al.*, 2008, Monahan *et al.*, 2009). Erst kürzlich konnten Yamaguchi *et al.* nachweisen, dass Zellaggregate von Leptospiren eine Biofilm-ähnliche Struktur in den Nierentubuli chronisch infizierter Mäuse bildeten. Die intermittierende Ausscheidung von Leptospiren in den Urin chronisch infizierter Tiere könnte durch die Ablösung von Teilen des tubulären Biofilms erklärt werden (Yamaguchi *et al.*, 2018).

Brihuega *et al.* konnten *in-vivo*-Zellaggregate von Leptospiren im Plazentagewebe infizierter Meerschweinchen nachweisen, die möglicherweise mit der Bildung von Biofilm einhergehen (Brihuega *et al.*, 2012).

4. Equine Rezidivierende Uveitis

4.1. Definition und Vorkommen

Bei der Equinen Rezidivierenden Uveitis handelt es sich um eine ein- oder beidseitig auftretende, akut und chronisch-rezidivierend verlaufende Entzündung der Uvea, die mit einer serofibrinösen und plasmazellulären Entzündung von Iris, Ziliarkörper, Chorioidea und benachbarten Augenstrukturen einhergeht. Die progrediente Zerstörung intraokularer Strukturen kann zur Atrophie und Erblindung des betroffenen Auges führen (Gerhards & Wollanke, 2001).

Die ERU gilt als eine der bedeutendsten Augenerkrankungen bei Pferden und wird als Hauptursache der Erblindung beschrieben (Deeg *et al.*, 2002, Gilger & Michau, 2004, Gilger & Deeg, 2011). Sie tritt weltweit auf, jedoch mit geographisch variierender Prävalenz. Für Deutschland und Europa gilt eine Prävalenz von bis zu 10 % (Szemes & Gerhards, 2000, Kulbrock, 2013). Als besonders niedrig wird die Prävalenz in Großbritannien gesehen, sie liegt hier bei 1 % (Lowe, 2010). In den USA wird dagegen von einer Prävalenz von bis zu 25 % ausgegangen (Gilger, 2010, Gilger & Deeg, 2011).

Die Erkrankung kann bei Pferden jeden Alters auftreten, wobei Pferde am häufigsten zwischen vier und sechs Jahren erkranken. 23 % der betroffenen Pferde zeigen die ERU an beiden Augen. Nach Wollanke (2002) erkranken in einem Patientengut von 929 Pferden Wallache häufiger als Hengste und Stuten. Dieses Ergebnis ist möglicherweise erklärbar durch den stabilisierenden Effekt der Sexualhormone auf das Bindegewebe, dessen Bestandteile zum Teil auch im Glaskörper zu finden sind. Die Infektionsanfälligkeit des Glaskörpers könnte so vermindert werden. Des Weiteren wurde eine Rasse-Prädisposition vermutet, da Warmblüter, Quarter Horses und Isländer relativ häufig betroffen waren (Wollanke, 2002).

4.2. Einteilung, Symptome und Verlauf

Die ERU kann in eine vordere Uveitis, eine hintere Uveitis und eine Panuveitis eingeteilt werden (Wollanke, 2002). Bei vorderen Uveitiden kommt es zur schmerzhaften Entzündung von Iris und Ziliarkörper, die von sero-fibrinösen, selten auch sero-hämorrhagischen oder purulenten Ergüssen in die vordere Augenkammer begleitet ist. Hintere Uveitiden betreffen die Chorioidea, gehen mit herdförmigen Entzündungen einher und sind weniger schmerzhaft. Da akute Schmerzsymptome ausbleiben, werden sie häufig nicht erkannt und es kommt schleichend zur Erblindung des Auges (Gerhards & Wollanke, 2001). Die Panuveitis beschreibt die Entzündung aller Gewebe der Uvea, bei der sich sowohl in der vorderen Augenkammer als auch im Glaskörperbereich Entzündungsprodukte ansammeln (Wollanke, 2002).

Im Folgenden werden Symptome und Verlauf der ERU stichwortartig beschrieben (Gerhards & Wollanke, 2001, Wollanke, 2002, Gilger & Michau, 2004, Frellstedt, 2009, Gilger & Deeg, 2011):

Mögliche Symptome der akuten Uveitis:

- deutliche Abwehrtrias (Photophobie, Blepharospasmus, Epiphora)
- ödematöse Lidschwellung und vermehrte Wärme
- gerötete Konjunktiven mit injizierten Gefäßen
- diffus hauchartig getrübe Hornhaut
- sero-fibrinöser, sero-hämorrhagischer oder selten purulenter Erguss in der vorderen Augenkammer
- Miosis
- Glaskörpertrübung

Der akute Schub verläuft meist über zwei bis drei Wochen. Nachfolgende, rezidivierende Entzündungsschübe treten in unregelmäßigen, meist kürzer werdenden Abständen auf. In der Regel nimmt die Schwere der Symptomatik mit jedem weiteren Schub zu.

Mögliche Folgen chronisch-rezidivierender Entzündungen:

- Bulbusatrophie bis Phthisis bulbi
- chronische Keratitis
- vordere und hintere Synechie, Irisresiduen auf der Linsenvorderfläche
- Linsentrübung, Präzipitate auf der Linsenrückfläche
- Linsenluxation oder -subluxation
- Einlagerungen im Glaskörper, Glaskörpertrübung
- chorioretinale Narben
- Netzhautablösung
- Sekundärglaukom aufgrund von gestörtem Kammerwasserabfluss durch Entzündungsprodukte

Es werden drei verschiedene Verläufe der ERU beschrieben: die „klassische“, „heimtückische“ und „hintere“ ERU. Die klassische ERU tritt am häufigsten auf und ist durch akute schmerzhafte, rezidivierende Entzündungsschübe gekennzeichnet. Zwischen den Schüben klingt die Entzündung ab und das Auge ist reizfrei. Die heimtückische ERU weist einen schleichenden Verlauf mit subakuten Entzündungsschüben auf, die nie ganz abklingen und chronisch verlaufen. Die Pferde zeigen oft keine deutliche Schmerzsymptomatik, sodass Besitzer häufig erst nach Erblindung des Auges reagieren. Die hintere ERU zeigt sich durch rezidivierende Entzündungsschübe, die hauptsächlich im Glaskörperraum ablaufen und Trübungen des Glaskörpers, Kataraktbildung der Linse, Netzhaut-Degenerationen und -Ablösungen verursachen.

4.3. Ätiologie und Pathogenese

Obwohl der Zusammenhang zwischen intraokularer Leptospirose und ERU bereits in mehreren Studien zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wird die Ätiologie der ERU bis heute von manchen Autoren kontrovers diskutiert (Gerhards & Wollanke, 2001, Wollanke, 2002, Wollanke *et al.*, 2004, Deeg, 2008, Gilger & Deeg, 2011). So wird die ERU von manchen Autoren als eine Autoimmunerkrankung beschrieben und nicht mit einer okularen Leptospiren-Infektion in Zusammenhang gebracht. Die Beteiligung von Autoantigenen im Auge (retinales S-Antigen und IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein*)) bei den autoimmunen Entzündungsreaktionen der ERU stützt diese Hypothese zwar (Deeg *et al.*, 2001, Deeg *et al.*, 2002, Deeg *et al.*, 2002, Deeg, 2008), schließt eine

Leptospiren-Infektion als primäre Ursache jedoch nicht aus. Infektions-assoziierte Autoimmunphänomene sind bei verschiedenen Krankheiten bekannt (Wollanke *et al.*, 2004).

Wollanke *et al.* gelang bei Untersuchungen von an ERU erkrankten Pferdeaugen zwischen 1998 und 2001 bei über 50 % von 358 Glaskörperproben ein kultureller Leptospiren-Nachweis, wobei am häufigsten Leptospiren der Serogruppe Grippotyphosa auftraten. Mittels PCR konnte bei über 70 % der untersuchten Proben Leptospiren-DNA nachgewiesen werden. Die positiven Kulturergebnisse korrelierten signifikant mit dem Nachweis erhöhter Antikörpertiter gegen Leptospiren im Glaskörper. Dabei entsprach die durch Mikroagglutinationsreaktion (MAR) ermittelte Serogruppe bei 96 % der des angezüchteten Leptospiren-Isolats (Wollanke *et al.*, 2004). Gesell führte zum Vergleich Untersuchungen zu Leptospiren bei 168 gesunden Pferdeaugen durch. Der kulturelle Ansatz und die MAR waren bei allen Proben negativ, durch PCR konnte bei lediglich 5 % der Proben Leptospiren-DNA nachgewiesen werden (Gesell, 2004).

Untersuchungen zu Antikörpertitern aus Glaskörper- und Serumproben ergaben bei an ERU erkrankten Pferden stets einen signifikant höheren Wert im Glaskörper als im Serum, sodass bei 94 % der untersuchten Augen eine intraokulare Antikörper-Produktion bestätigt werden konnte (Wollanke, 2002).

Durch Vitrektomie und dadurch Entfernung der ursächlichen Leptospiren konnte bei 98 % der Pferde Rezidivfreiheit erreicht werden (Wollanke *et al.*, 2004, Schinagl, 2017). Des Weiteren zeigten sich die Antikörpertiter in operierten Augen rückläufig und waren ein Jahr nach Vitrektomie nicht mehr in der MAR nachweisbar (Wollanke *et al.*, 2004).

Wurden Antikörpertiter im Serum von augengesunden Pferden mit an ERU erkrankten Pferden verglichen, konnte kein signifikanter Unterschied erkannt werden. Die Seroprävalenz lag in beiden Gruppen bei mindestens 75 % (Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke *et al.*, 2004).

Immunhistologische Untersuchungen konnten bei an ERU erkrankten Augen eine Infiltration von T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen nachweisen, die bei Untersuchungen von gesunden Augen nicht erkennbar waren (Dubielzig, 1997, Romeike *et al.*, 1998, Gilger *et al.*, 1999). Dabei konnten Plasmazellaggregate im Bereich des Ziliarkörper-Epithels dargestellt werden, die vermutlich für die

intraokulare Antikörper-Produktion im Zuge der ERU verantwortlich sind (Dubielzig, 1997, Romeike *et al.*, 1998).

Die typischerweise mit chronischen Infektionen einhergehende Ablagerung von AA-Amyloid konnte auch bei an ERU erkrankten Augen festgestellt werden (Østevik *et al.*, 2014, Linke *et al.*, 2019). AA-Amyloid entsteht durch unvollständige Proteolyse von Serum Amyloid A (SAA), das bei chronischen Entzündungen über längere Zeit erhöht vorliegt (Papa & Lachmann, 2018). Waldner *et al.* untersuchten den intraokularen SAA-Wert von an ERU erkrankten Augen im Vergleich zu gesunden Augen und konnten einen signifikant höheren SAA-Wert bei Augen mit intraokularer Leptospiren-Infektion feststellen. Dabei korrelierte die Menge des nachgewiesenen SAA mit der Höhe des intraokularen Antikörpertiters gegen Leptospiren (Waldner, 2017, Waldner *et al.*, 2018). Linke *et al.* wiesen eine intraokulare SAA-Produktion durch Epithelzellen nach, die im Zuge der ERU im Auge ausgelöst wird. Die Ablagerung von AA-Amyloid im Auge, besonders im Bereich des Ziliarkörpers und im Kammerwinkel, führt zur Zerstörung des Ziliarkörpers, zu einem verminderten Kammerwasser-Abfluss und zur Entstehung eines Sekundärglaukoms (Linke *et al.*, 2019). Histologische Untersuchungen mit chronisch an ERU erkrankten Augen zeigten mittel- bis hochgradige Amyloidablagerungen auf dem Ziliarkörper (Cielewicz, 2014).

Erst kürzlich wurde außerdem eine Beteiligung von NETs in der Pathogenese der ERU nachgewiesen. Im Vergleich zu gesunden Pferdeaugen konnte in an ERU erkrankten Augen eine größere Menge an NET-Markern festgestellt werden. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Glaskörpermaterial an ERU erkrankter Augen konnte sowohl eine vesikuläre NET-Bildung als auch eine NET-Freisetzung durch Membranruptur und Zelllyse dargestellt werden (Fingerhut *et al.*, 2019).

Es wird davon ausgegangen, dass sich die Mehrzahl der Pferde im jungen Alter mit Leptospiren infiziert (Wollanke, 2002). Werden frühzeitig schützende Antikörper gebildet, kann je nach Virulenz der Leptospiren und Infektionsdosis eine intraokulare Infektion verhindert werden (Wollanke *et al.*, 2004). Wandern die Leptospiren dennoch ins Augeninnere ein, können diese Monate bis Jahre dort persistieren, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen (Williams *et al.*, 1971, Wollanke *et al.*, 2004). Immunsuppressive intraokulare Mechanismen könnten dabei eine Rolle spielen, da das Auge als immunologisch privilegierter Ort

überschießende Immunreaktionen effektiv zurückdrängen kann. Während dieser Phase werden die Erreger im Auge möglicherweise nicht ausreichend erkannt und eliminiert (Wollanke, 2002, Wollanke *et al.*, 2004, Gilger & Deeg, 2011).

Wie genau Leptospiren im Auge die rezidivierenden Uveitisschübe auslösen, ist nicht abschließend geklärt. Fakt ist aber, dass es im Zuge der Uveitis zu einem Zusammenbruch der Blut-Augen-Schranke kommt, woraufhin immunkompetente Zellen in das Augeninnere eindringen können. Das Gleichgewicht zwischen immunsuppressiven und immunstimulierenden Mechanismen ist gestört und es kommt zu überschießenden Immunreaktionen, die das Augeninnere schädigen (Deeg *et al.*, 2002, Wollanke *et al.*, 2004, Gilger & Deeg, 2011). Dabei werden möglicherweise ursächliche Leptospiren eliminiert und das Gleichgewicht im Auge wiederhergestellt, sodass der Uveitisschub selbstlimitierend abklingt (Williams *et al.*, 1971, Wollanke, 2002). Die vollständige Erregerelimination ist jedoch nicht möglich. Im Auge zurückbleibende Leptospiren persistieren im Glaskörperraum und bleiben zwischen den Entzündungsschüben vor dem Immunsystem versteckt (Wollanke, 2002).

Es gibt verschiedene Theorien über das Auslösen der Uveitiden. Wollanke vermutet dabei unter anderem eine Vermehrung der (versteckten) Leptospiren, die dadurch einen erneuten Antigen-Kontakt herstellen und eine Entzündung auslösen. Auch die Entstehung von lokalen Immunkomplexen wird vermutet, die durch ständige Leptospirenpräsenz gebildet, gegen diese aber unwirksam sind (Wollanke, 2002).

Verma *et al.* wiesen nach, dass gegen Leptospiren gerichtete Antikörper auch an Linsen- und retinale Proteine binden und so zur autoimmunen Pathogenese der ERU beitragen können. Dabei identifizierten sie die Leptospirenproteine LruA und LruB (*Leptospiral recurrent uveitis associated proteins A und B*), die vermutlich ähnliche immunrelevante Epitope besitzen wie Proteine im Auge. Kreuzreaktive Wechselwirkungen der Antikörper scheinen so zur Schwere der autoimmunen Reaktionen beizutragen (Verma *et al.*, 2008, Verma *et al.*, 2010).

4.4. Diagnose

Für die klinische Diagnose der ERU ist eine umfassende ophthalmoskopische Untersuchung und gezielte Anamneseerhebung von großer Bedeutung. Können dabei Anzeichen akuter oder vorangegangener Entzündungsschübe im Auge festgestellt werden (siehe 3.2) und sind vorberichtlich wiederholt schmerzhafte

Phasen aufgetreten, kann klinisch von einer ERU gesprochen werden (Gilger & Deeg, 2011).

Sprechen ophthalmoskopische Befunde und / oder Vorbericht nicht eindeutig für das Vorliegen einer Leptospiren-bedingten Uveitis, sollte zur Sicherung der Diagnose eine Kammerwasserprobe aus der vorderen Augenkammer entnommen und untersucht werden. Dabei kann das Vorliegen von Leptospiren-Antikörpern durch MAR oder ELISA getestet und Leptospiren-DNA durch PCR nachgewiesen werden (Wollanke *et al.*, 2004, Roczek, 2008, Loibl, 2009, Loibl *et al.*, 2018). Aufgrund der hohen Seroprävalenz bei augengesunden Pferden eignet sich eine serologische Untersuchung auf Leptospiren-Antikörper nicht zur Diagnosestellung (Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke *et al.*, 2004).

4.5. Therapie und Prognose

Die Hauptziele der Therapie der ERU liegen im Erhalt der Sehkraft und der Kontrolle der intraokularen Entzündung, um bleibende Schäden des Auges und wiederkehrende Schmerzen zu verhindern (Gerhards & Wollanke, 2001, Gilger & Michau, 2004, Gilger & Deeg, 2011). Beim akuten Uveitisschub ist lediglich eine symptomatische Therapie mit Mydriatika (Atropin) und Antiphlogistika möglich – langfristig ist sie jedoch nicht in der Lage, die Erblindung des Auges zu verhindern (Gerhards & Wollanke, 2001, Wollanke, 2002, Gilger & Michau, 2004). Durch die Pupillen-erweiternde Wirkung von Atropin-haltigen Augenmedikamenten soll der Synechiebildung vorgebeugt werden, durch die antiphlogistische Therapie (Dexamethason lokal, Phenylbutazon oder Flunixin-Meglumin systemisch) Schmerzen und Entzündung reduziert werden (Gerhards & Wollanke, 2001).

Um wiederkehrende Uveitisschübe zu verhindern, hat sich die Vitrektomie zur Entfernung intraokularer Leptospiren und Entzündungsprodukte bewährt und als höchst effektiv gezeigt (Frühauf *et al.*, 1998, Gerhards *et al.*, 1999, Gerhards & Wollanke, 2001, Schinagl, 2017). Unter transpupillärer Kontrolle wird durch das gleichzeitig schneidende und absaugende Vitrektom das Glaskörpermaterial zu mindestens 90 % entfernt und der Glaskörperraum bei konstantem Augeninnendruck mit balancierter Salzlösung aufgefüllt (Gerhards & Wollanke, 2005). Wird die Operation rechtzeitig durchgeführt, kann für die Rezidivfreiheit und den Erhalt der Sehfähigkeit eine sehr gute Prognose gestellt werden (Werry & Gerhards, 1992, Frühauf *et al.*, 1998, Gerhards *et al.*, 1999, Gerhards & Wollanke,

2001, Wollanke, 2002, Schinagl, 2017). Einer retrospektiven Langzeitstudie zufolge, die den Therapieerfolg von Pferden bis 18 Jahre nach OP untersuchte, konnte durch die Vitrektomie eine Rezidivfreiheit von 96,3 % erzielt werden (Schinagl, 2017).

Als weitere chirurgische Therapiemethode wird – vor allem in den USA – das Einsetzen eines Cyclosporin A (CsA) -Implantats in den Subarachnoidalraum des Auges praktiziert. Durch das konstante Freisetzen von CsA in den Ziliarkörper soll eine immunsuppressive Wirkung erzielt werden. Diese Methode eignet sich allerdings nur bei Pferden, die gut auf eine entzündungshemmende Therapie ansprechen, nach Absetzen der Therapie jedoch frühzeitig neue Schübe erleiden. Limitierend ist außerdem die Tatsache, dass der Wirkspiegel des Implantats nur über einen Zeitraum von etwa drei Jahren aufrechterhalten werden kann und das Implantat im Anschluss erneuert werden muss (Gilger & Deeg, 2011, Kleinpeter, 2019). Eine Verbesserung der Sehfähigkeit durch die Entfernung von entzündlichen Einlagerungen im Glaskörper kann – im Gegensatz zur Vitrektomie – ebenfalls nicht erreicht werden (Tóth, 2006).

Zudem wird in den letzten Jahren die intravitreale Gentamicin-Injektion als mögliche Therapiemethode der ERU untersucht. Dabei werden unter Sedation oder Allgemeinanästhesie 4 mg bzw. 6 mg Gentamicin in den Glaskörperraum injiziert (Fischer *et al.*, 2019, Kleinpeter, 2019, Launois *et al.*, 2019). Durch die Bindung von Gentamicin an intraokulare Proteine soll trotz geringer Konzentration ein hoher, langanhaltender Wirkspiegel erreicht werden (Kleinpeter, 2019). Die Ergebnisse vorliegender Studien zeigten Erfolgsraten von 60 - 90 % für eine Rezidivfreiheit und 70 % in Hinblick auf den Visuserhalt (Fischer *et al.*, 2019, Kleinpeter, 2019, Launois *et al.*, 2019). Dabei konnten Augen im fortgeschrittenen Stadium der ERU in Hinblick auf den Visuserhalt weniger von der Injektion profitieren, da im Gegensatz zur Vitrektomie Visuseinschränkungen durch Glaskörpertrübungen und Entzündungsprodukte im Glaskörper nicht beeinflusst werden können (Kleinpeter, 2019). Da bisherige Studien keine Langzeiterfolge in Bezug auf Visuserhalt und Rezidivfreiheit liefern können (letzter Untersuchungszeitpunkt maximal drei Jahre nach Injektion), kann bisher keine langfristige Prognose gestellt werden.

4.6. Untersuchungen mit Glaskörper an ERU erkrankter Augen

Abgesehen von Kultur, PCR und verschiedenen Antikörper-Tests auf Leptospiren (Wollanke, 2002, Wollanke *et al.*, 2004, Loibl, 2009, Loibl *et al.*, 2018) wurden mit im Rahmen von Vitrektomien gewonnenen Glaskörperproben aus an ERU erkrankten Augen weitere Untersuchungen durchgeführt.

Der Glaskörper füllt den Raum zwischen Netzhaut, Linse, Zonulafasern und Ziliarkörper, umfasst beim Pferd ein Volumen von ca. 28 ml und macht so etwa 4/5 des gesamten Augapfel-Volumens aus (Wissdorf *et al.*, 2002). Er besteht aus einem gelartigen Material, das sich aus extrazellulärer Matrix mit einem Wasseranteil von über 98 % zusammensetzt. Die Gelstruktur wird durch ein Netzwerk aus unverzweigten Kollagenfibrillen aufrechterhalten, das Kollagen vom Typ II, V/XI und IX enthält. Weitere Bestandteile sind Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Heparansulfat (Bishop, 2000). Abbildung 7 zeigt eine elektronenmikroskopische Darstellung des Glaskörpergerüsts eines gesunden Pferdeauges.

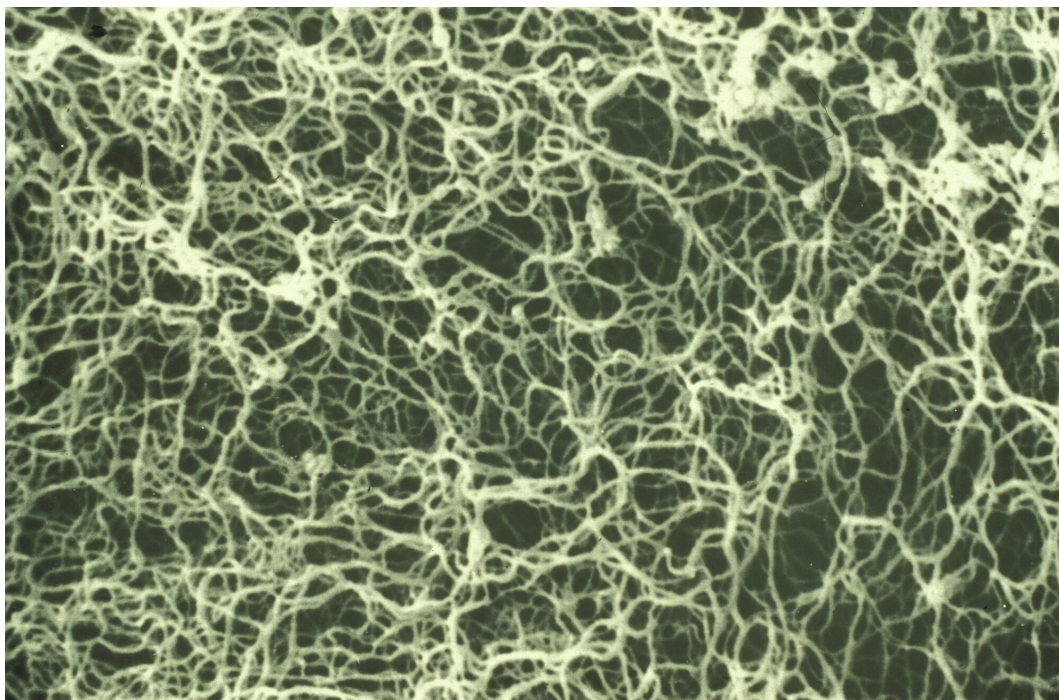


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Darstellung des Glaskörpergerüsts eines gesunden Pferdeauges (Wollanke, 2002)

Der Glaskörper kann in die Glaskörperbasis (im Bereich des Ziliarkörpers), die Glaskörperrinde (der Netzhaut anliegend) und das Zentralgel (zentraler Bereich des Glaskörpers) eingeteilt werden (Mahajan & Skeie, 2014). Der gesunde Glaskörper

ist weitestgehend azellulär, es befindet sich lediglich eine geringe Konzentration an Hyalozyten (Glaskörperzellen) in Glaskörperrinde und -basis (Bishop, 2000).

Das Auge als immunprivilegiertes Organ wird durch verschiedene Mechanismen vor (überschießenden) Entzündungsreaktionen geschützt. Dabei verhindert die Blut-Augen-Schranke als physische Barriere den Ein- und Austritt von Immunzellen und Makromolekülen. Zusätzlich hemmen immunsuppressive Faktoren, die zellgebunden oder gelöst vorliegen, die Aktivität immunkompetenter Zellen im Auge (Zhou & Caspi, 2010). Während eines Uveitis-Schubes im Zuge der ERU kommt es jedoch zu einem Zusammenbruch der Blut-Augen-Schranke, woraufhin immunkompetente Zellen in das Augennere eindringen können. Das Gleichgewicht zwischen immunsuppressiven und immunstimulierenden Mechanismen ist gestört, sodass es zu überschießenden Immunreaktionen kommt (Deeg *et al.*, 2002, Wollanke *et al.*, 2004, Gilger & Deeg, 2011).

Untersuchungen zur Zelldichte im Glaskörper an ERU erkrankter Augen zeigte eine signifikant höhere Zelldichte als im Glaskörper gesunder Augen. Dabei nahm der Zellgehalt mit dem Fortschreiten der ERU zu – mit steigender Glaskörpertrübung und zunehmenden Einlagerungen im Glaskörper war auch eine höhere Zelldichte nachweisbar. Plasmazellen und Makrophagen waren vermehrt in den Einlagerungen im Glaskörper erkennbar, während sich Lymphozyten vorrangig in den flüssigen Anteilen des Glaskörpers befanden (Roth, 2013, Roth *et al.*, 2014).

Die zunehmende Zellzahl ergänzt Ergebnisse vorausgegangener Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass der Grad der Glaskörpertrübung mit der Höhe der Antikörpertiter korreliert (Wollanke, 2002).

Elektronenmikroskopische Darstellungen von Glaskörperproben an ERU erkrankter Pferde zeigten Leptospiren, die von einer Schicht feinkörniger Substanz umgeben sind (siehe Abbildung 8 links) (Niedermaier, 2002, Brandes *et al.*, 2007). Bei experimenteller Injektion von Kulturleptospiren in ein gesundes Pferdeauge und anschließender Gewinnung der Glaskörperprobe konnte diese Substanz nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8 rechts) (Niedermaier, 2002). Brandes *et al.* vermuten, dass Leptospiren in an ERU erkrankten Augen durch die Veränderung ihrer Oberfläche vor dem Immunsystem geschützt sein könnten. Dabei könnte eine Maskierung der Leptospiren durch Wirtsproteine eine Rolle spielen (Brandes *et al.*, 2007).

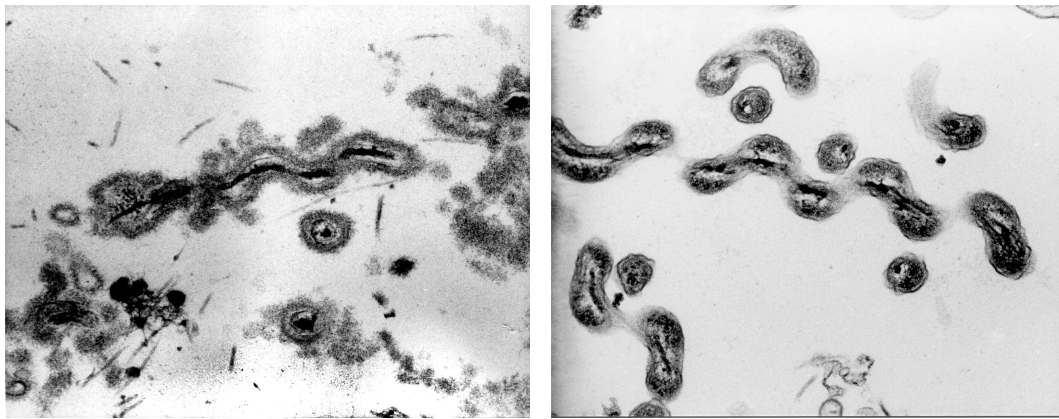


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus Glaskörperproben

Links: Darstellung von Leptospiren (-anschnitten) aus Glaskörpermaterial an ERU erkrankter Pferde. Auf der Zelloberfläche ist eine feinkörnige Substanz zu erkennen. Rechts: Darstellung von Kultur-Leptospiren nach experimenteller Injektion in ein gesundes Pferdeauge. Die Zelloberfläche erscheint hier glatt und ohne Auflagerungen. (Niedermaier, 2002)

Brandes *et al.* untersuchten außerdem ein Pferdeauge, das zum Zeitpunkt der Vitrektomie klinische Anzeichen eines akuten Uveitis-Schubes zeigte. Im Vergleich zu den Augen, die im entzündungsfreien Intervall vitrektomiert wurden, konnten deutlich mehr freie Leptospiren nachgewiesen werden. Hier waren außerdem zahlreiche intakte Entzündungszellen (Makrophagen, PMNs, Plasmazellen und Lymphozyten) erkennbar. Abbildung 9 zeigt eine Leptospire, die durch einen neutrophilen Granulozyt phagozytiert wird und eine den Kulturleptospiren ähnliche Zelloberfläche aufweist. Der neutrophile Granulozyt war außerdem von kugelförmigen Strukturen umgeben, die zum Teil phagozytiert wurden (Brandes *et al.*, 2007).

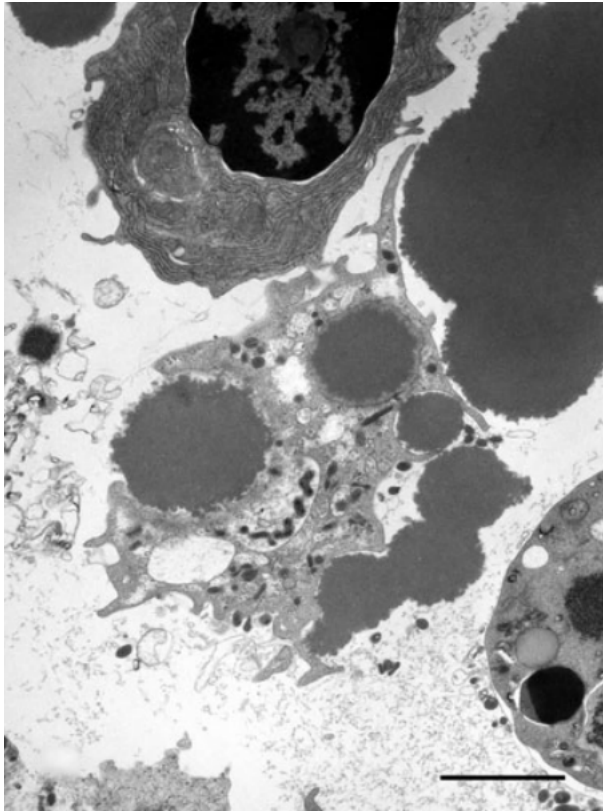


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Phagozyten mit intrazellulärer Leptospire

Darstellung eines neutrophilen Granulozyten mit phagozytierter Leptospire aus Glaskörpermaterial eines Pferdes, das zum Zeitpunkt der Vitrektomie klinische Anzeichen einer Uveitis zeigte. Die Oberfläche der phagozytierten Leptospire erscheint relativ glatt. In der Umgebung des Phagozyts befinden sich kugelförmige Strukturen, die zum Teil phagozytiert wurden. (Brandes *et al.*, 2007)

Zur Evaluierung einer möglichen Therapiemethode der ERU mit systemischen Antibiotika wurden Glaskörperproben nach intravenöser Enrofloxacin-Therapie auf Leptospiren untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne antibiotische Vorbehandlung war der kulturelle Nachweis zwar tendenziell schwieriger, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht festgestellt werden. Obwohl die Enrofloxacin-Konzentration im Glaskörper deutlich über der *in vitro* bestimmten MIC und MBC von Leptospiren lag, war der kulturelle Nachweis von Leptospiren aus Glaskörpermaterial antibiotisch behandelter Pferde noch bei 30 % positiv (Popp, 2011, Popp *et al.*, 2013).

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Überblick über die bakterielle Biofilm-Bildung und ihre Beteiligung bei persistierenden Infektionen anhand der bestehenden Literatur geschaffen. Die Equine Rezidivierende Uveitis ist eine durch Leptospiren ausgelöste, chronische Erkrankung des Pferdeauges, bei welcher Leptospiren im Glaskörperraum persistieren und rezidivierende Entzündungsschübe auslösen. In der folgenden Diskussion wird gezeigt, dass sich die Merkmale Biofilm-assoziiierter Infektionen auch in der Pathogenese der ERU wiederfinden und daher eine Beteiligung von Leptospiren-Biofilm bei der ERU anzunehmen ist. Darüber hinaus werden Parallelen in der Diagnostik und in Therapieansätzen diskutiert und die mögliche Biofilm-Bildung im Glaskörper dargestellt.

1. ERU als Biofilm-assoziierte Infektion

1.1. Typische Merkmale Biofilm-assoziiierter Infektionen

Nach Hall-Stoodley *et al.* sollte bei jeder chronischen und rezidivierenden Infektion das Vorliegen einer Biofilm-assoziierten Infektion vermutet werden (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Biofilm-assoziierte Infektionen sind typischerweise chronische bakterielle Infektionen, die durch eine persistente und progressive Pathologie charakterisiert sind. Als wichtigstes gemeinsames Merkmal wird die persistierende Entzündungsreaktion in der Umgebung des Biofilms gesehen (Hoiby *et al.*, 2015).

Die allgemeinen Merkmale von Biofilm-assoziierten Infektionen (siehe III.2.4.3.1.) können fast vollständig in der Pathogenese der ERU wiedergefunden werden. Die Kriterien zur Definition von Biofilm-assoziierten Infektionen wurden von Parsek *et al.* und Hall-Stoodley *et al.* postuliert (Parsek & Singh, 2003, Hall-Stoodley & Stoodley, 2009) und können wie folgt auf die Eigenschaften der ERU angewandt werden:

- a. Infizierende Bakterien sind an ein Substrat oder an eine Oberfläche gebunden.

Die Bindung von Leptospiren an ein Substrat oder eine Oberfläche im Auge ist bisher nicht nachgewiesen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass sich die intraokularen Leptospiren im Glaskörper aufhalten und sich dort im Gerüst der

Glaskörperfibrillen vor dem Immunsystem „verstecken“ können. Eine Bindung an Bestandteile des Glaskörpers ist daher naheliegend – insbesondere, weil nach Entfernung des Glaskörpers durch Vitrektomie keine Leptospiren mehr im Auge nachweisbar sind und die typische Symptomatik der ERU ausbleibt (Wollanke, 2002).

- b. Direkte Untersuchung des infizierten Gewebes zeigt Bakterien, die in Zellaggregaten oder Mikrokolonien leben und von extrazellulärer Matrix umgeben sind.

Leptospiren können durch mikroskopische Untersuchungen von Glaskörperproben, die durch die Vitrektomie bei an ERU erkrankten Pferden gewonnen wurden, dargestellt werden. Dabei zeigen sich sowohl einzelne Leptospiren, die von extrazellulärem Material umgeben sind (Niedermaier, 2002, Brandes *et al.*, 2007), als auch kugelförmige Strukturen (Brandes *et al.*, 2007), die Abbildungen von Leptospiren-Biofilm *in vitro* ähneln. Auf die mögliche Biofilm-Bildung im Glaskörper wird unter V.2. genauer eingegangen.

- c. Die Infektion ist im Allgemeinen auf eine bestimmte Lokalisation beschränkt. Obwohl eine bakterielle Streuung auftreten kann, handelt es sich dabei um ein sekundäres Phänomen.

Die hohe Seroprävalenz von Leptospiren-Antikörpern bei Pferden zeigt, dass sich die meisten Pferde in den ersten Lebensjahren mit Leptospiren infizieren (Wollanke, 2002). Kommt es zur intraokularen Leptospirose und Manifestation der ERU, beschränkt sich die Symptomatik allein auf das Auge. Da die Infektion des Auges hämatogen erfolgt und sich das Immunsystem im Zuge der primären Infektion mit dem Erreger auseinandersetzt und diesen aus der Blutbahn eliminiert, ist eine Streuung von Leptospiren aus dem Auge in die Blutbahn und andere Organe unwahrscheinlich.

- d. Die Infektion ist nicht oder nur schwer durch Antibiotika zu eliminieren, obwohl der verantwortliche Organismus in seinem planktonischen Zustand sensibel gegenüber den angewandten Antibiotika ist.

Die intravitreale Gentamicin-Injektion zur Bekämpfung der Leptospiren im Auge ist eine Therapiemethode, die bisherigen Studien zufolge eine gute Erfolgsrate in Bezug auf Rezidivfreiheit zeigt (Fischer *et al.*, 2019). Ob die Leptospiren dadurch

tatsächlich aus dem Glaskörper eliminiert werden, ist nicht bekannt. Durch die Retina-schädigende Wirkung von Aminoglykosiden kann lediglich eine geringe Dosis Gentamicin gefahrlos injiziert werden (Zachary & Forster, 1976), sodass die Wirksamkeit in Bezug auf Elimination der Bakterien im Glaskörper fraglich ist. Derzeit liegen noch keine Langzeitergebnisse zur intravitrealen Gentamicin-Injektion vor – möglicherweise könnte dadurch aber nur ein kurzfristiger Therapieerfolg erzielt werden.

- e. Kultur-negative Ergebnisse trotz starker Vermutung der Infektion mit dem betreffenden Erreger

Bei an ERU erkrankten Augen können regelmäßig hohe Antikörpertiter gegen Leptospiren im Kammerwasser nachgewiesen werden. Vergleiche mit dem jeweiligen Serum-Antikörpertiter betroffener Pferde weisen auf eine intraokulare Antikörper-Produktion hin; diese konnte durch den Goldmann-Witmer-Koeffizienten bestätigt werden (Wollanke *et al.*, 2004). Demnach kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass sich Leptospiren im Auge befinden. Trotz Optimierung der Kultivierungsbedingungen für Leptospiren sind die Ergebnisse des Kulturnachweises noch bei knapp 50 % der Glaskörperproben negativ (Wollanke *et al.*, 2001, Wollanke, 2002, Gesell, 2004).

- f. Ineffektive Immunabwehr, nachgewiesen durch bakterielle Zellaggregate, die in wirtseigenem Gewebe von Entzündungszellen umgeben sind

Die bei der Vitrektomie gewonnenen Glaskörperproben zeigen Zellaggregate von Leptospiren, die jedoch nur vereinzelt von Entzündungszellen umgeben sind. Grund dafür könnte sein, dass die Vitrektomie in der Regel nicht im akuten Entzündungsschub durchgeführt wird. Durch die Schutzmechanismen im Auge vor überschießenden Entzündungsreaktionen wird die immunologische Antwort im entzündungsfreien Intervall erfolgreich unterdrückt, sodass eine Immunreaktion in der Umgebung des Leptospiren-Biofilms mikroskopisch nicht nachgewiesen werden kann. Brandes *et al.* untersuchten Glaskörpermaterial eines an ERU erkrankten Auges, das zum Zeitpunkt der Vitrektomie klinische Anzeichen einer Uveitis zeigte. Hier konnten vermehrt Entzündungszellen und freie Leptospiren nachgewiesen werden, die zum Teil auch phagozytiert vorlagen (Brandes *et al.*, 2007).

1.2. Parallelen im Krankheitsverlauf

Beim Vergleich der Pathogenese der ERU mit den klassischen Biofilm-assoziierten Infektionen wie der Mukoviszidose, der chronischen Wundinfektion und der Parodontitis können zahlreiche Parallelen erkannt werden. Der Beginn der Erkrankung ist meist subklinisch und es kann bis zum Auftreten der klinischen Symptome eine relativ lange Inkubationszeit vergehen. Infektionsstudien mit Ponys zeigten, dass zwischen Infektionszeitpunkt und Auftreten der ersten Uveitis Monate bis Jahre vergehen können (Williams *et al.*, 1971). Während dieser Zeit scheinen Leptospiren im Glaskörper zu persistieren, ohne eine klinische Entzündung auszulösen (Wollanke, 2002). Ähnliches wird bei chronischen Wundinfektionen beobachtet. Nach bakterieller Kontamination kommt es zur Anhaftung von Bakterien an Wirtsgewebe und der Bildung von Biofilm. Die zunächst niedrige Proliferationsrate der Bakterien führt lediglich zu einer stillen Entzündung mit subklinischen Symptomen (Percival, 2017). Kommt es im Laufe der Biofilmentwicklung zur vermehrten Freisetzung von Exotoxinen, QS-Molekülen und eDNA, wird das Immunsystem zunehmend aktiviert und Gewebeschädigungen treten auf (Percival *et al.*, 2012, Newton *et al.*, 2017). Möglich wäre, dass Leptospiren nach Eintritt über die Blut-Augen-Schranke an Glaskörpermaterial binden und es dort zunächst zur stillen Vermehrung und Biofilm-Bildung kommt. Ist nach Proliferation der Bakterien eine gewisse Konzentration von QS-Signalmolekülen im Biofilm erreicht, werden Teile des Biofilms abgespalten und darin enthaltene Leptospiren bewegen sich frei im Glaskörperraum. Das Immunsystem wird durch die freiwerdenden Bakterien getriggert und es kommt zur Immunreaktion, wodurch die klinischen Symptome einer akuten Uveitis ausgelöst werden.

Es wird davon ausgegangen, dass Leptospiren im Glaskörper persistieren und erst bei Vermehrung und Austritt aus dem Glaskörper für das Immunsystem erkennbar sind. Die physiologischen Schutzmechanismen des Auges können eine überschießende Immunreaktion bei niedriger Bakterienzahl im Auge erfolgreich unterdrücken. Während der Vermehrung der Leptospiren wird schließlich eine Schwelle erreicht, ab welcher das Immunsystem so stark aktiviert wird, dass diese Schutzmechanismen nicht mehr wirken und ein Entzündungsschub ausgelöst wird (Wollanke, 2002). Wird dieses Phänomen unter dem Aspekt der möglichen Biofilm-Bildung im Glaskörper betrachtet, könnten die Leptospiren im Biofilm

zunächst vor der Erkennung durch das Immunsystem geschützt sein. Bei Studien mit anderen Bakterien-Stämmen wurde bereits nachgewiesen, dass die Opsonisierung von Bakterien im Biofilm erschwert ist und Abwehrmechanismen des Immunsystems dadurch eingeschränkt sind (siehe III.2.4.3.2.) (Cerca *et al.*, 2006, Kristian *et al.*, 2008). Kommt es im Zuge der Abspaltung von Biofilm zur Freisetzung von Bakterien, gehen diese vom Biofilm-Phänotyp in den planktonischen Phänotyp über und werden für das Immunsystem wieder erkennbar (Rollet *et al.*, 2009, Otto, 2013). Im Fall der ERU könnte die Abspaltung von Teilen des Leptospiren-Biofilms so eine Immunreaktion auslösen, da plötzlich freiwerdende, planktonische Leptospiren im Glaskörperraum vorkommen.

Leptospiren, die sich frei im Glaskörperraum bewegen, kommen mit der Uvea in Kontakt, lösen eine intraokulare Antikörper-Produktion aus und können nach Opsonisierung durch Phagozytose eliminiert werden (Wollanke, 2002). Untersuchungen durch Brandes *et al.* unterstützen diese Theorie. Sie untersuchten eine Glaskörperprobe, die während eines akuten Uveitis-Schubes gewonnen wurde und von einem an ERU erkrankten Pferd stammte. Dabei ließen sich vermehrt freie, vermutlich planktonische Leptospiren nachweisen, die teilweise intrazellulär in Phagolysosomen vorlagen (Brandes *et al.*, 2007). Während dieser akuten Entzündungsphase kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, die über eine Immunkomplex-medierte Entzündung das umliegende Gewebe schädigen (Wollanke, 2002).

Diese Schädigung des umliegenden Gewebes wird auch bei Mukoviszidose, chronischen Wunden und Parodontitis beobachtet (Wolcott *et al.*, 2008, Bjarnsholt *et al.*, 2009, Hall-Stoodley *et al.*, 2012, Kinane *et al.*, 2017). Bakterien im Biofilm werden durch die massive Entzündungsreaktion jedoch nicht beeinflusst, sodass es lediglich zur Elimination der planktonischen Bakterien kommt. Die Bildung von Leptospiren-Biofilm im Auge könnte demnach dazu führen, dass die Erreger im Glaskörper trotz kompetenter Immunreaktionen im Auge persistieren können. Der Uveitis-Schub klingt ohne Therapie in der Regel nach zwei bis drei Wochen ab (Wollanke, 2002). Da die planktonischen Leptospiren, die den Schub auslösen, durch die Entzündung eliminiert werden, ist der Glaskörperraum aus Sicht des Immunsystems daraufhin „frei“. Immunsuppressive Mechanismen greifen wieder und ein entzündungsfreies Intervall beginnt. Zwischen den Entzündungsschüben ist dementsprechend ein niedriger Antikörpertiter im Auge nachzuweisen, während im

akuten Schub die Antikörperproduktion zunimmt und der Titer steigt (Wollanke, 2002).

Die chronische *P.-aeruginosa*-Infektion bei Mukoviszidose-Patienten ist durch die Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa* in den Atemwegen und einen dadurch ausgelösten chronischen Entzündungszustand charakterisiert. Dabei wird das Lungengewebe durch die anhaltende Entzündung geschädigt, die durch die Anwesenheit von *P.-aeruginosa*-Biofilm aufrechterhalten wird. Die Unfähigkeit des Immunsystems, die Bakterien im Biofilm zu eliminieren, führt so zur Abnahme der Lungenfunktion, die schließlich im Lungenversagen endet. Der progressive Verlauf ist durch Phasen klinischer Verschlechterung gekennzeichnet, in denen es zur Abspaltung und Streuung des Biofilms in bisher nicht-infizierte Lungenbereiche kommt (Bjarnsholt *et al.*, 2009). Möglich wäre, dass planktonische Leptospiren während des Uveitis-Schubes zum Teil an neue Bereiche des Glaskörpers binden und dort weiteren Biofilm bilden. Die Zunahme von Biofilm im Auge könnte in den Phasen der Biofilm-Streuung zu einer immer höheren Anzahl an planktonischen Leptospiren im Glaskörperraum führen, wodurch die Immunreaktion mit der Zeit immer gravierender wird. Demzufolge würde der Schweregrad der Uveitiden im Laufe der Zeit zunehmen – ein Phänomen, das bei der ERU durchaus beobachtet werden kann (Gilger & Deeg, 2011).

Wie auch bei der chronischen *P.-aeruginosa*-Infektion scheinen die Leptospiren im Auge selbst nicht für die Gewebeschädigung verantwortlich zu sein (Wollanke *et al.*, 2004). Bei Mukoviszidose-Patienten führt die Unfähigkeit des Immunsystems, die Bakterien im Biofilm zu eliminieren, zu chronischen Entzündungszuständen und irreversibler Schädigung des umliegenden Gewebes (Bjarnsholt *et al.*, 2009). Durch die Schutzmechanismen des Auges als immunprivilegiertes Organ kann die Entzündung zwischen den Uveitisschüben meist erfolgreich zurückgedrängt werden (Wollanke *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Lunge um ein Organ, das durch den ständigen Luftkontakt mit der Außenwelt auf ein stets präsent und hochreagibles Immunsystem angewiesen ist. Ein vollständiges Abklingen der Symptome zwischen den Phasen der Biofilm-Streuung ist aufgrund der ständigen Biofilmpräsenz daher sehr unwahrscheinlich, sodass im Gegensatz zur ERU eine dauerhaft anhaltende Entzündung beobachtet werden kann (Højby *et al.*, 2010).

Im weiteren Verlauf der ERU kommt es zur progressiven Schädigung der inneren Augenstrukturen, die ohne Behandlung zur Erblindung führt (Gerhards & Wollanke, 2001). Eine progressive Gewebeschädigung wird auch bei Parodontitis, Mukoviszidose und chronischen Wunden beobachtet. Frühzeitiger Zahnverlust bei Parodontitis und Lungenversagen durch die chronische *P. aeruginosa*-Infektion bei Mukoviszidose-Patienten sind dabei Langzeitfolgen dieser Biofilm-assoziierten Infektionen (Høiby *et al.*, 2010, Kinane *et al.*, 2017). Die irreversible Gewebeschädigung mit Funktionsverlust des betroffenen Organs stellt daher eine weitere Gemeinsamkeit zwischen Biofilm-assoziierten Infektionen und der ERU dar. Die Beteiligung von Biofilm bei der Pathogenese der ERU sollte daher in Betracht gezogen werden.

1.3. Parallelen in der Diagnostik

Die Diagnostik stellt bei Biofilm-assoziierten Infektionen eine besondere Herausforderung dar. Im Gegensatz zu planktonischen Bakterien sind Bakterien im Biofilm deutlich schlechter durch kulturelle Anzucht nachweisbar. Dabei spielt die Probennahme eine entscheidende Rolle. Die Bakterien im Biofilm haften an körpereigenem Gewebe und sind durch die Matrix geschützt, sodass durch eine Beprobung der Biofilm-Umgebung (beispielsweise durch Tupferprobe) häufig keine Bakterien nachgewiesen werden können. Dagegen werden Gewebeproben empfohlen, um die Wahrscheinlichkeit der Erregerisolierung zu erhöhen (Hall-Stoodley *et al.*, 2012, Hoiby *et al.*, 2015).

Die Ätiologie der ERU wird bis heute von einigen Autoren kontrovers diskutiert (Deeg *et al.*, 2004, Deeg, 2008). Dabei ist eines der Hauptargumente gegen die Leptospiren-Infektion als Ursache der ERU der oft negative Kulturnachweis. Hierbei muss jedoch deutlich zwischen der Art des Probenmaterials unterschieden werden. Geht man tatsächlich von einer Biofilm-assoziierten Pathogenese der ERU aus, kann die kulturelle Anzucht von Leptospiren aus Kammerwasserproben mit der Kultur aus Tupferprobenmaterial verglichen werden. Es wird lediglich die Umgebung des Biofilms getestet und die Isolierung der Leptospiren ist meist nicht erfolgreich. Bei Untersuchungen durch Wollanke war der Kulturnachweis aus Kammerwasserproben von an ERU erkrankten Augen bei knapp 17 % positiv (Wollanke, 2002). Wird dagegen eine invasivere Beprobung durchgeführt (Biopsie bzw. Glaskörpermaterial durch Vitrektomie), steigen die Chancen des positiven Kulturnachweises. So kann bei über 50 % der Glaskörperproben aus an ERU

erkrankten Augen ein positiver Leptospiren-Nachweis durch Kultur erzielt werden (Wollanke *et al.*, 2001, Wollanke, 2002, Gesell, 2004, Wollanke *et al.*, 2004).

Hall-Stoodley *et al.* deuten außerdem darauf hin, dass die Kultur von Bakterien im Biofilm dadurch erschwert ist, dass die Umgebungsbedingungen *in vivo* nicht ausreichend imitiert werden können. Lebende, aber nicht kultivierbare Bakterienzellen könnten dabei eine Rolle spielen (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Möglicherweise ist das Vorkommen von nicht kultivierbaren Bakterienzellen in Leptospiren-Biofilm der Grund dafür, dass trotz Optimierung der Kulturbedingungen nur bei knapp über 50 % der Glaskörperproben ein positiver Kulturnachweis möglich ist.

Bei der Diagnostik von Biofilm-assoziierten Infektionen wird häufig auf die Diskrepanz zwischen kulturellen und molekulardiagnostischen Nachweismethoden hingewiesen (Hall-Stoodley *et al.*, 2012). Auch bei der ERU kann durch PCR-Nachweis aus Glaskörperproben mit höherer Wahrscheinlichkeit ein positives Ergebnis auf Leptospiren erzielt werden (70 %), als durch kulturellen Nachweis (53 %) (Wollanke, 2002). Auch hier könnten lebende, aber nicht kultivierbare Bakterien im Biofilm eine Rolle spielen. Das Vorkommen von leptospiraler eDNA in der Biofilm-Matrix könnte zusätzlich zu einem positiven PCR-Nachweis führen.

Die Kammerwasserpunktion zur ERU-Diagnostik erfolgt in der Regel nicht im akuten Entzündungsschub, sondern in Phasen der Symptomfreiheit. Geht man von einer Biofilm-assoziierten Pathogenese aus, könnten während des Uveitisschubes möglicherweise mit höherer Wahrscheinlichkeit Leptospiren durch Kultur oder PCR nachgewiesen werden. Diesbezüglich gibt es bisher jedoch keine Untersuchungen – insbesondere, weil der akute Uveitisschub mit klassischen Symptomen meist als Merkmal zur Diagnosestellung ausreicht und die Kammerwasserpunktion dabei an diagnostischem Wert verliert. Findet die Untersuchung dagegen im reizfreien Zustand statt und sind keine typischen Veränderungen im Auge zu erkennen, hat die Kammerwasserpunktion zur Untersuchung auf Leptospiren-Antikörper einen hohen Stellenwert.

Der Nachweis von Leptospiren-Antikörpern bei an ERU erkrankten Augen aus Kammerwasser- und Glaskörperproben unterscheidet sich im Gegensatz zum Leptospiren-Nachweis nur gering. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass der Antikörpertiter während des akuten Entzündungsschubes erhöht ist und nach

Abklingen der Symptome wieder abnimmt (Wollanke, 2002). Demzufolge scheint die Antikörperproduktion während der akuten Uveitis, möglicherweise durch das Vorkommen von planktonischen Leptospiren, getriggert zu werden und nach Elimination der auslösenden Erreger zu sistieren.

1.4. Parallelen im Therapieansatz

Bakterien im Biofilm sind durch ihre zahlreichen Mechanismen zur Resistenz und Toleranz gegenüber Antibiotika nur schwer durch eine antibiotische Therapie zu eliminieren. Die mechanische Entfernung des Biofilms stellt meist den ersten Schritt in der ursächlichen Behandlung Biofilm-assoziiierter Infektionen dar und ist häufig die einzige Chance auf anhaltenden Therapieerfolg (siehe III.2.4.3.4.).

Die erfolgreiche Therapie der ERU setzt sich aus der symptomatischen, entzündungshemmenden Therapie der akuten Uveitis und der chirurgischen Entfernung des Glaskörpers durch Vitrektomie zusammen (Gerhards & Wollanke, 2001). Nach Entfernung des Glaskörpers und der darin enthaltenen Leptospiren bleiben die Entzündungsschübe aus und es kommt in 96,3 % der Fälle zu anhaltender Rezidivfreiheit (Schinagl, 2017). Wird die ERU unter dem Aspekt der leptospiralen Biofilm-Bildung im Glaskörper betrachtet, entspricht die Vitrektomie der mechanischen Entfernung des Biofilms, wodurch ursächliche Bakterien entfernt werden und eine weitere Schädigung des umliegenden Gewebes ausbleibt.

Biofilm-assoziierte Infektionen wie chronische Wunden und Parodontitis werden nach demselben Prinzip behandelt. Zur ursächlichen Therapie muss zunächst der Biofilm entfernt werden (infizierte Beläge und nekrotisches Material in chronischen Wunden bzw. Zahnbelag bei Parodontitis). Im Anschluss kann eine lokale antibiotische Therapie erfolgen, um zurückbleibende planktonische Bakterien zu bekämpfen (Høiby *et al.*, 2011, Keast *et al.*, 2014, Kinane *et al.*, 2017). Die bei der Vitrektomie verwendete Spüllösung (*Balanced Salt Solution*) zur Aufrechterhaltung des intraokularen Drucks wird mit einer geringen, noch Netzhaut-verträglichen Dosis Gentamicin versetzt, sodass es auch bei der Vitrektomie im Anschluss an die Entfernung des Glaskörpers zur lokalen antibiotischen Behandlung kommt (Wollanke *et al.*, 2004). Der Erfolg dieser Behandlungsmethode könnte wie bei chronischen Wunden oder Parodontitis darin begründet sein, dass der Großteil der Bakterien durch die Entfernung des Biofilms entfernt wurden und zurückbleibende, möglicherweise planktonische Bakterien

durch lokale antibiotische Therapie eliminiert und an erneuter Biofilm-Bildung gehindert werden.

Die antibiotische Therapie der ERU durch intravitreale Gentamicin-Injektion wird derzeit untersucht. Aufgrund der Netzhaut-schädigenden Wirkung von Aminoglykosiden gilt die intravitreale Gentamicin-Injektion jedoch als umstritten (Shikari & Samant, 2016). Untersuchungen zeigten, dass Gentamicin lediglich bis zu einer Konzentration von 100 µg pro ml Glaskörper injiziert werden kann, ohne dass Schäden der Netzhaut auftreten. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu histopathologischen Veränderungen der Netzhaut und Erblindung (Zachary & Forster, 1976). Die bisher praktizierte Injektion von 4 mg bzw. 6 mg Gentamicin entspricht bei gleichmäßiger Verteilung im Glaskörper des Pferdes einer Konzentration von 133 µg bzw. 200 µg und übersteigt damit die gefahrlos anzuwendende Konzentration. Studien zur Pharmakokinetik von intravitreal applizierten Substanzen weisen außerdem darauf hin, dass ihre Konzentrationen im Glaskörper einer hohen Fluktuation unterliegen (del Amo & Urtti, 2015). Die Injektion von 0,05 ml einer 100 mg/ml Gentamicinlösung in den Glaskörper des Pferdes (Fischer *et al.*, 2019) könnte bei unregelmäßiger Verteilung daher zu regional sehr hohen Konzentrationen mit potenziell Netzhaut-schädigender Wirkung führen. In Bereichen mit niedrigen Konzentrationen wird möglicherweise der nötige Wirkspiegel nicht erreicht, sodass es nicht zur vollständigen Elimination der Leptospiren im Glaskörper kommt. Eine weitere Rolle spielt die intravitreale Clearance, durch die applizierte Substanzen über die Blut-Augen-Schranke oder durch Kammerwasser-Austausch aus dem Auge eliminiert werden. Niedermolekulare Substanzen zeigen dabei eine schnelle Elimination aus dem Glaskörper (del Amo & Urtti, 2015).

Die Anwendung von Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen muss bezüglich ihrer Auswirkung auf die bakterielle Biofilm-Bildung als besonders kritisch betrachtet werden. Bei zahlreichen Bakterien-Stämmen kann eine vermehrte Biofilm-Bildung unter subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen festgestellt werden (Ranieri *et al.*, 2018, Waack & Nicholson, 2018, Penesyan *et al.*, 2019). Geht man von einer leptospiralen Biofilm-Bildung im Glaskörper aus, könnte die subinhibitorische Konzentration von Gentamicin in manchen Bereichen des Glaskörpers zur vermehrten Biofilm-Bildung führen, wodurch die Streuung von Biofilm und Freisetzung von planktonischen Leptospiren unterdrückt wird. Die

beschriebene (vorübergehende) Rezidivfreiheit nach Gentamicin-Injektion könnte möglicherweise auf vermehrte Biofilm-Bildung und reduzierte Freisetzung von Leptospiren zurückgeführt werden – nicht jedoch auf die Elimination des Erregers. Langzeitstudien über Rezidivfreiheit nach Gentamicin-Injektion und Untersuchungen von Glaskörpermaterial auf persistierende Leptospiren trotz Gentamicin-Injektion könnten darüber Aufschluss geben.

Untersuchungen zur systemischen Enrofloxacin-Therapie bei an ERU erkrankten Pferden zeigten trotz Erreichen eines (gemäß MIC und MBC) adäquaten Wirkspiegels im Auge keine wesentliche Elimination der Erreger aus dem Glaskörper. Der im Anschluss durchgeführte Kulturnachweis von Leptospiren aus Glaskörpermaterial war im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne antibiotische Behandlung etwas weniger erfolgreich, der Unterschied erreichte jedoch kein Signifikanzniveau (Popp, 2011, Popp *et al.*, 2013). Die eingeschränkte Wirksamkeit von Enrofloxacin gegen Leptospiren im Glaskörper könnte auf eine intravitreale Biofilm-Bildung zurückzuführen sein. Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass die Empfindlichkeit von Leptospiren im Biofilm gegenüber Antibiotika im Vergleich zu planktonischen Leptospiren deutlich reduziert ist (Vinod Kumar *et al.*, 2016). Möglicherweise führt die subinhibitorische Konzentration von Enrofloxacin auch zu vermehrter Biofilm-Bildung, wodurch der Kulturnachweis im Anschluss erschwert ist.

Die Schädigung des umliegenden Gewebes durch anhaltende Immunreaktionen stellt ein Hauptmerkmal Biofilm-assoziiierter Infektionen dar. Dementsprechend kann durch immunsuppressive Therapie eine vorübergehende Besserung der Symptomatik erzielt werden. Während des akuten Entzündungsschubs der ERU kann durch lokale und systemische Therapie mit Kortikosteroiden und NSAIDs die fortschreitende Schädigung der inneren Augenstrukturen vermindert werden (Gerhards & Wollanke, 2001). Bei der chronischen *P.-aeruginosa*-Infektion von Mukoviszidose-Patienten bringt die symptomatische Therapie mit Kortikosteroiden ebenfalls vorübergehende Besserung. Da es sich hierbei jedoch um eine chronisch-anhaltende Entzündung handelt, müsste zur anhaltenden Linderung der Symptomatik eine dauerhafte Entzündungshemmung angestrebt werden. Die dauerhafte Therapie mit systemischen Kortikosteroiden führt bei Mukoviszidose-Patienten zu zahlreichen Nebenwirkungen wie Glukoseintoleranz, Kataraktbildung und Wachstumshemmung (Eigen *et al.*, 1995, Cheng *et al.*, 2000).

Die lokale Anwendung von Kortikosteroiden erweist sich als schwierig, da Inhalationspräparate den Ort der Entzündung durch die Schleimbildung in den Atemwegen nicht effektiv erreichen (Ross *et al.*, 2009). Da die chirurgische Entfernung des Biofilms in den Atemwegen von Mukoviszidose-Patienten nicht möglich ist, kann das Fortschreiten der Lungenschädigung nur durch die Inhalation von sekretolytischen und biofilmauflösenden Präparaten in Kombination mit intensiver Antibiotikatherapie verlangsamt werden. Ein derartiger Therapieansatz mit intensiver lokaler Antibiotika-Anwendung wäre bei der ERU nicht denkbar, da das Auge im Vergleich zur Lunge deutlich sensibler auf Antibiotika reagiert.

Die Therapie von Biofilm-assoziierten Infektionen muss trotz der Gemeinsamkeiten in der Pathogenese stets auf die jeweilige Lokalisation angepasst werden. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die mechanische Entfernung der Bakterien im Biofilm die Therapiemöglichkeit mit der größten Heilungswahrscheinlichkeit darstellt. Obwohl die leptospirale Biofilm-Bildung im Glaskörper noch nicht eindeutig nachgewiesen wurde, trifft diese These auf die ERU als möglicherweise Biofilm-assoziierte Infektion gleichermaßen zu.

2. Biofilm-Bildung im Glaskörper

Nach Eintritt der Leptospiren über die Blut-Augen-Schranke sind diese in der Lage, im Augeninneren zu persistieren und für die ERU typische Entzündungsschübe auszulösen. Durch Untersuchungen von Kammerwasserproben und Glaskörpermaterial erkrankter Pferde konnte nachgewiesen werden, dass die Leptospiren dabei im Glaskörperraum lokalisiert sind. Die Entfernung des Glaskörpers durch Vitrektomie führt in 98 % der Fälle zu Rezidivfreiheit und der intraokulare Leptospiren-Antikörpertiter geht zurück. Ein Jahr post-OP sind keine Leptospiren-Antikörper mehr im Kammerwasser nachweisbar (Wollanke *et al.*, 2004). Es ist also davon auszugehen, dass sich die intraokularen Leptospiren im Glaskörper befinden und möglicherweise an Glaskörpermaterial anhaften.

Leptospiren sind in der Lage, an Wirtsgewebe zu binden und dadurch ins Gewebe einzuwandern und Gewebeschichten zu penetrieren. Durch *in-vitro*-Studien konnte eine Vielzahl von Oberflächenproteinen nachgewiesen werden, die die Bindung an EZM-Bestandteile ermöglichen. Die Oberflächenproteine LigA, LigB und LipL32 können beispielsweise an verschiedene Kollagentypen und Glykosaminoglykane binden (Murray, 2015).

Der Glaskörper besteht aus einem gelartigen Material, das durch ein Netzwerk aus unverzweigten Kollagenfibrillen aufrechterhalten wird (siehe III.4.6. Abbildung 7) (Bishop, 2000). Aufgrund der Bindungskapazität von Leptospiren an Kollagen wäre daher denkbar, dass Leptospiren im Auge an Bestandteile des Glaskörpers binden. Im gesunden Auge und besonders im Glaskörper befindet sich nur eine sehr geringe Anzahl an immunkompetenten Zellen (Niedermaier *et al.*, 2006, Roth, 2013), die eine Einwanderung von Leptospiren in den Glaskörper und die Anhaftung an Glaskörpermaterial verhindern könnten. Der Glaskörper stellt durch den immunprivilegierten Status also die ideale Umgebung für eine (zunächst unerkannte) Biofilm-Bildung durch eingewanderte Leptospiren dar.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von Glaskörpermaterial aus an ERU erkrankten Augen zeigen Leptospiren, die von einem feinkörnigen Material umgeben sind (siehe Abbildung 10). Bei experimentell in ein gesundes Pferdeauge injizierten Kultur-Leptospiren kann dieses Material nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Demzufolge scheint das Material erst während der Persistenz der Leptospiren im Auge zu entstehen.

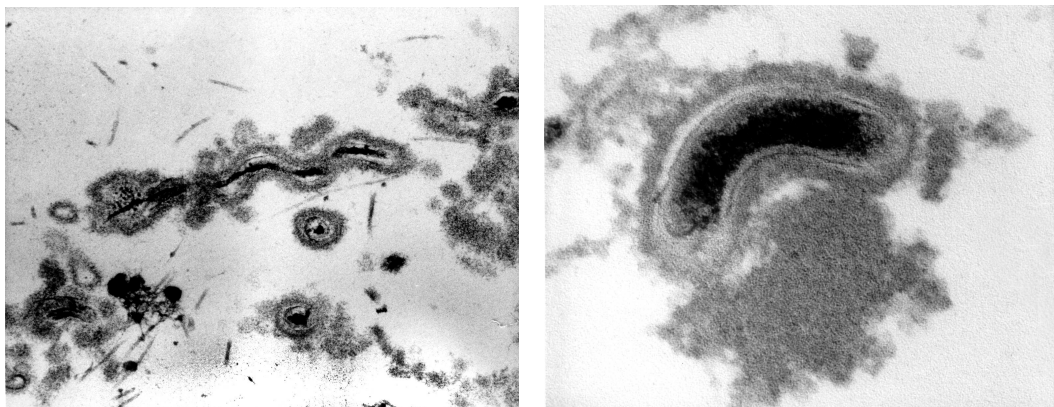


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus an ERU erkrankten Augen

Die Leptospiren sind von einem feinkörnigen Material umgeben, das vermutlich während der Persistenz im Auge synthetisiert wird. (Niedermaier, 2002)

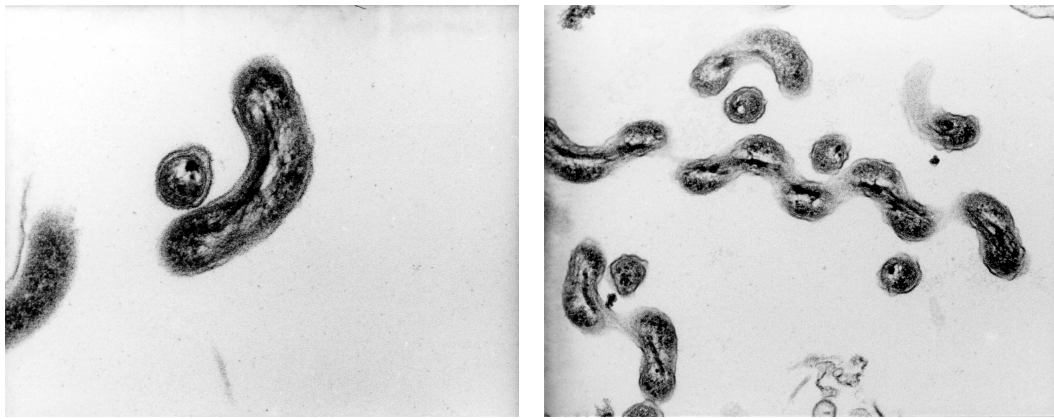


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Darstellung von Kultur-Leptospiren

Bei Kultur-Leptospiren, die experimentell in ein gesundes Auge injiziert wurden, kann das feinkörnige Material aus Abbildung 10 nicht nachgewiesen werden. (Niedermaier, 2002)

Durch Rasterelektronenmikroskopie können in ERU-Glaskörperproben außerdem kugelförmige Strukturen dargestellt werden, aus denen fädige, Leptospiren-ähnliche Strukturen hervorragen (siehe Abbildung 12). Beim Vergleich mit Mikroskopiebildern von Leptospiren-Biofilm *in vitro* (siehe Abbildung 13) kann eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den kugelförmigen Strukturen aus Glaskörperproben und Biofilm-bildenden Leptospiren-Aggregaten erkannt werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um leptospiralen Biofilm, der im Glaskörper gebildet wurde.

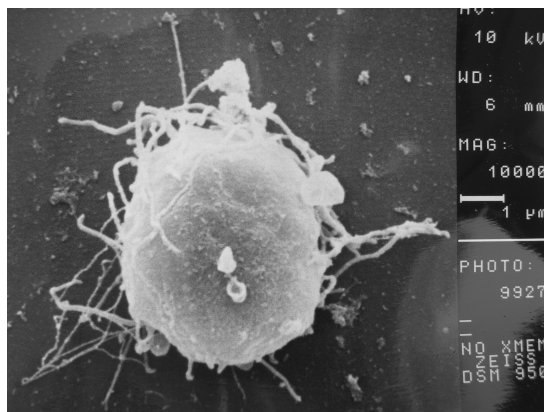


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von ERU-Glaskörperproben

Kugelförmige Strukturen, aus denen fädige, Leptospiren-ähnliche Strukturen hinausragen. Möglicherweise handelt es sich hier um Leptospiren-Biofilm. (Wollanke, 2020)

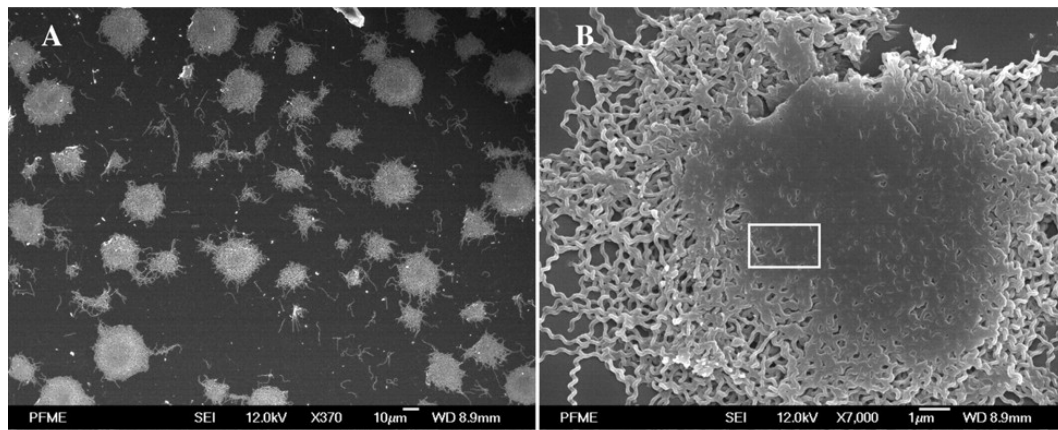


Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren-Biofilm

Leptospiren-Biofilme *in vitro* zeigen sich als dicht gepackte, rundliche Zellaggregate umgeben von Biofilm-Matrix. Auch hier ragen zahlreiche Leptospiren aus der Biofilm-Struktur heraus. (Ristow *et al.*, 2008)

Der Nachweis von NETs in Glaskörperproben an ERU erkrankter Augen (Fingerhut *et al.*, 2019) könnte die Theorie einer intravitrealen Biofilm-Bildung von Leptospiren weiter unterstützen. Aufgrund der gegenseitigen Stimulation von Biofilm- und NET-Bildung am Infektionsort wird vermutet, dass NETs in Zusammenhang mit Biofilmen auftreten und bei Vorliegen von *in-vivo*-Biofilm auch eine NET-Freisetzung nachgewiesen werden kann (Papayannopoulos, 2019).

Obwohl die Biofilm-Bildung von Leptospiren im Glaskörper noch nicht abschließend nachgewiesen wurde, deuten die vorliegenden Abbildungen sehr darauf hin. Die Fähigkeit der Leptospiren zur Bindung an Glaskörperfibrillen ermöglicht den ersten Schritt der Biofilm-Bildung: die Anhaftung an eine Oberfläche. Dies würde dem Vorgang entsprechen, der auch für die Biofilm-Produktion von Leptospiren in aquatischen Systemen beschrieben wurde (Vinod Kumar *et al.*, 2016).

3. Ausblick

Der Wissensstand zur Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* übersteigt das Wissen über Leptospiren-Biofilm zum jetzigen Zeitpunkt um ein Vielfaches. Allein die zahlreichen Untersuchungen zu individuellen Matrix-Bestandteilen und deren Notwendigkeit zur Biofilm-Bildung machen deutlich, dass Biofilme großer Diversität unterliegen. Bisherige Untersuchungen mit an ERU erkrankten Augen könnten darauf hinweisen, dass Leptospiren im Glaskörper Biofilm bilden. Dennoch wird intensive Forschung zu *in-vitro*-Leptospiren-Biofilmen und ihren

Matrix-Bestandteilen nötig sein, um endgültige Aussagen über Leptospiren-Biofilme *in vivo* treffen zu können.

Die Forschung zur Ätiologie der Equinen Rezidivierenden Uveitis und die Beteiligung von intraokularem Leptospiren-Biofilm ist noch nicht abgeschlossen. Zukünftige Untersuchungen im Bereich der Biofilm-Bildung könnten in den nächsten Jahren aufschlussreiche Erkenntnisse liefern. Obwohl die Vitrektomie sich bereits als erfolgreiche Therapiemethode der ERU etabliert hat, könnte das Wissen über die Beteiligung von Leptospiren-Biofilm diesen Therapieansatz – die Entfernung des ursächlichen Biofilms bei Biofilm-assoziierten Infektionen – weiter unterstützen. Möglicherweise können auch Ansätze zu weiteren und weniger invasiven Therapiemöglichkeiten aufgezeigt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Biofilm-Bildung von Bakterien hat in den letzten Jahren zunehmend an medizinischer Bedeutung gewonnen. Bei vielen chronischen bakteriellen Infektionen wurde die Beteiligung von Biofilm bereits nachgewiesen. Biofilm-assoziierte Infektionen werden durch einen chronischen und progressiven Krankheitsverlauf charakterisiert, der mit immunmediierter Gewebeschädigung einhergeht.

Die vorliegende Literaturstudie schafft einen Überblick über die bakterielle Biofilm-Bildung und stellt ihre Bedeutung bei Biofilm-assoziierten Infektionen dar. Es werden die Eigenschaften von Biofilm und die für seine Entstehung maßgeblichen Voraussetzungen erläutert. Die relevanten pathophysiologischen Mechanismen, die bei dessen Bildung *in vivo* auftreten, werden anhand ausgewählter Biofilm-assoziiierter Infektionen beschrieben. Die Equine Rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine chronische Erkrankung des Pferdeauges, die durch Leptospiren ausgelöst und durch ihre Persistenz im Glaskörper unterhalten wird. Basierend auf dem aktuellen Forschungsstand wird diskutiert, welche der in der Literatur dargestellten Mechanismen und Fakten dafürsprechen, dass es sich bei der ERU um eine Biofilm-assoziierte Infektion handelt.

Bakterien im Biofilm sind vor der Wirkung des Immunsystems geschützt und nur schwer durch Antibiotika zu eliminieren. Chronische bakterielle Infektionen werden daher häufig mit der Bildung von Biofilm in Zusammenhang gebracht. Die Persistenz der Leptospiren im Glaskörper löst wiederkehrende Entzündungsschübe aus, die eine Schädigung der inneren Augenstrukturen zur Folge haben und unbehandelt zur Erblindung des Pferdes führen. Da Leptospiren im Glaskörper des Pferdes persistieren und Leptospiren grundsätzlich zur Biofilm-Bildung fähig sind, wäre eine intraokulare Biofilm-Bildung als Persistenz-Mechanismus denkbar.

Beim Vergleich der ERU mit Biofilm-assoziierten Infektionen wie der chronischen *Pseudomonas-aeruginosa*-Infektion bei Mukoviszidose-Patienten, Parodontitis und der chronischen Wundinfektion können zahlreiche Parallelen in Pathogenese, Diagnostik und Therapie erkannt werden. Bisher durchgeführte Untersuchungen von Glaskörpermaterial an ERU erkrankter Pferde weisen ebenfalls auf eine intraokulare Biofilm-Bildung durch Leptospiren hin. Zum jetzigen Zeitpunkt

scheint die Bildung von Biofilm im Glaskörper des Pferdes sehr wahrscheinlich und könnte eine Erklärung sowohl für die Persistenz der Leptospiren im Auge als auch für den chronisch rezidivierenden Verlauf bieten. Die intraokulare Biofilm-Bildung könnte zudem erklären, warum der Kulturnachweis aus Glaskörpermaterial trotz begründeten Verdachts auf eine Leptospiren-Infektion häufig nicht zuverlässig ist. Des Weiteren könnten die bei der ERU nachgewiesenen Autoimmunphänomene durch die Präsenz von Biofilm im Glaskörper ausgelöst werden. Weitere Forschung zur Biofilm-Bildung von Leptospiren wird nötig sein, um die intravitreale Biofilm-Bildung bei an ERU erkrankten Pferden abschließend zu bestätigen.

VI. SUMMARY

The formation of bacterial biofilm has gained increasing medical importance in recent years. The involvement of biofilm has been demonstrated in many chronic infections. Biofilm-associated infections are characterized by a chronic and recurrent course of the disease, which is associated with immune-mediated tissue damage.

The present literature study provides an overview of bacterial biofilm formation and presents its importance in biofilm-associated infections. The characteristics of biofilm and the conditions that are required for its formation are presented. The relevant pathophysiological mechanisms that occur *in vivo* during its formation are described by means of selected biofilm associated infections. Equine Recurrent Uveitis (ERU) is a chronic disease of the equine eye caused by leptospira and maintained by their persistence in the vitreous. Based on the current state of research, it is discussed which of the mechanisms and facts presented in the literature suggest that ERU is a biofilm associated infection.

Biofilm bacteria are protected from the effects of the immune system and can hardly be eliminated by antibiotics. Chronic bacterial infections are therefore often associated with the formation of biofilms. The persistence of leptospira in the vitreous triggers recurring bouts of inflammation, which damage the internal eye structures and, if left untreated, lead to blindness in horses. Since leptospira can survive in the horse's vitreous and are capable of biofilm formation, intraocular biofilm formation could serve as a persistence mechanism.

When comparing ERU with biofilm-associated infections such as chronic *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients, periodontitis and chronic wound infection, numerous similarities in pathogenesis, diagnosis and therapy can be discovered. Previous investigations of vitreous material in horses with ERU also indicate intraocular biofilm formation by leptospira. At the present time, the formation of biofilm in the horse's vitreous seems very likely and could offer an explanation for both the persistence of leptospira in the eye and the chronic recurrent pattern of the disease. The intraocular biofilm formation could also explain why culture from vitreous material is often unreliable despite well-founded suspicion of an infection by leptospira. Furthermore, the autoimmune phenomena

observed in ERU could be induced by the presence of biofilm in the vitreous. Further research on biofilm formation by leptospira will be necessary in order to conclusively confirm the intravitreal biofilm formation in horses suffering from ERU.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdullahi U. F., Igwenagu E., Mu'azu A., Aliyu S. & Umar M. I. (2016). "Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine." Vet World **9**(1): 12-18. 10.14202/vetworld.2016.12-18

Abranches J., Martinez A. R., Kajfasz J. K., Chávez V., Garsin D. A. & Lemos J. A. (2009). "The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*." J Bacteriol **191**(7): 2248-2256. 10.1128/jb.01726-08

Bagge N., Ciofu O., Skovgaard L. T. & Høiby N. (2000). "Rapid development in vitro and in vivo of resistance to ceftazidime in biofilm-growing *Pseudomonas aeruginosa* due to chromosomal beta-lactamase." Apmis **108**(9): 589-600. 10.1034/j.1600-0463.2000.d01-102.x

Bagge N., Hentzer M., Andersen J. B., Ciofu O., Givskov M. & Høiby N. (2004). "Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **48**(4): 1168-1174. 10.1128/aac.48.4.1168-1174.2004

Barraud N., Hassett D. J., Hwang S.-H., Rice S. A., Kjelleberg S. & Webb J. S. (2006). "Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Bacteriology **188**(21): 7344-7353. 10.1128/jb.00779-06

Barraud N., Schleheck D., Klebensberger J., Webb J. S., Hassett D. J., Rice S. A. & Kjelleberg S. (2009). "Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal." J Bacteriol **191**(23): 7333-7342. 10.1128/jb.00975-09

Benakanakere M. & Kinane D. F. (2012). "Innate cellular responses to the periodontal biofilm." Front Oral Biol **15**: 41-55. 10.1159/000329670

Bessa L. J., Fazii P., Di Giulio M. & Cellini L. (2015). "Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection." Int Wound J **12**(1): 47-52. 10.1111/iwj.12049

Billings N., Millan M., Caldara M., Rusconi R., Tarasova Y., Stocker R. & Ribbeck K. (2013). "The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." PLoS Pathog **9**(8): e1003526. 10.1371/journal.ppat.1003526

Bilton D., Bellon G., Charlton B., Cooper P., De Boeck K., Flume P. A., Fox H. G., Gallagher C. G., Geller D. E., Haarman E. G., Hebestreit H. U., Kolbe J., Lapey A., Robinson P., Wu J., Zuckerman J. B. & Aitken M. L. (2013). "Pooled analysis of two large randomised phase III inhaled mannitol studies in cystic fibrosis." J Cyst Fibros **12**(4): 367-376. 10.1016/j.jcf.2012.11.002

Bishop P. N. (2000). "Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel." Prog Retin Eye Res **19**(3): 323-344. 10.1016/s1350-9462(99)00016-6

Bjarnsholt T., Jensen P., Burmølle M., Hentzer M., Haagensen J. A. J., Hougen H. P., Calum H., Madsen K. G., Moser C., Molin S., Høiby N. & Givskov M. (2005). "Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent." Microbiology **151**(Pt 2): 373-383. 10.1099/mic.0.27463-0

Bjarnsholt T., Jensen P., Fiandaca M. J., Pedersen J., Hansen C. R., Andersen C. B., Pressler T., Givskov M. & Høiby N. (2009). "Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients." Pediatr Pulmonol **44**(6): 547-558. 10.1002/ppul.21011

Blair J. M., Webber M. A., Baylay A. J., Ogbolu D. O. & Piddock L. J. (2015). "Molecular mechanisms of antibiotic resistance." Nat Rev Microbiol **13**(1): 42-51. 10.1038/nrmicro3380

Boles B. R. & Singh P. K. (2008). "Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12503-12508. 10.1073/pnas.0801499105

Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A. M., Ehrlich G. D. & Stewart P. S. (2004). "Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa*

in biofilms." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2659-2664. 10.1128/aac.48.7.2659-2664.2004

Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H. J. & Coenye T. (2011). "Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 2655-2661. 10.1128/aac.00045-11

Brady R. A., Leid J. G., Camper A. K., Costerton J. W. & Shirtliff M. E. (2006). "Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection." Infect Immun **74**(6): 3415-3426. 10.1128/iai.00392-06

Branda S. S., Vik S., Friedman L. & Kolter R. (2005). "Biofilms: the matrix revisited." Trends Microbiol **13**(1): 20-26. 10.1016/j.tim.2004.11.006

Brandes K., Wollanke B., Niedermaier G., Brem S. & Gerhards H. (2007). "Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospire." J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **54**(5): 270-275. 10.1111/j.1439-0442.2007.00921.x

Brauner A., Fridman O., Gefen O. & Balaban N. Q. (2016). "Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment." Nat Rev Microbiol **14**(5): 320-330. 10.1038/nrmicro.2016.34

Brihuega B., Samartino L., Auteri C., Venzano A. & Caimi K. (2012). "In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina." Rev Argent Microbiol **44**(3): 138-143.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y. & Zychlinsky A. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535. 10.1126/science.1092385

Brötz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H. P., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K., Bandow J. E., Sahl H. G. & Labischinski H. (2005). "Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics." Nat Med **11**(10): 1082-1087. 10.1038/nm1306

Burrows J. A., Toon M. & Bell S. C. (2003). "Antibiotic desensitization in adults with cystic fibrosis." Respirology **8**(3): 359-364. 10.1046/j.1440-1843.2003.00461.x

Byrd A. L., Belkaid Y. & Segre J. A. (2018). "The human skin microbiome." Nat Rev Microbiol **16**(3): 143-155. 10.1038/nrmicro.2017.157

Cai Y., Wang J., Liu X., Wang R. & Xia L. (2017). "A Review of the Combination Therapy of Low Frequency Ultrasound with Antibiotics." Biomed Res Int **2017**: 2317846. 10.1155/2017/2317846

Carmen J. C., Nelson J. L., Beckstead B. L., Runyan C. M., Robison R. A., Schaalje G. B. & Pitt W. G. (2004). "Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*." J Infect Chemother **10**(4): 193-199. 10.1007/s10156-004-0319-1

Causey R. C. (2006). "Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance." Vet J **172**(3): 405-421. 10.1016/j.tvjl.2005.08.005

Cerca N., Jefferson K. K., Oliveira R., Pier G. B. & Azeredo J. (2006). "Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state." Infect Immun **74**(8): 4849-4855. 10.1128/iai.00230-06

Chait R., Craney A. & Kishony R. (2007). "Antibiotic interactions that select against resistance." Nature **446**(7136): 668-671. 10.1038/nature05685

Chen A. I., Dolben E. F., Okegbe C., Harty C. E., Golub Y., Thao S., Ha D. G., Willger S. D., O'Toole G. A., Harwood C. S., Dietrich L. E. & Hogan D. A. (2014). "Candida albicans ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines." PLoS Pathog **10**(10): e1004480. 10.1371/journal.ppat.1004480

Cheng K., Ashby D. & Smyth R. (2000). "Oral steroids for cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev(2): Cd000407. 10.1002/14651858.Cd000407

Chiang W. C., Nilsson M., Jensen P., Høiby N., Nielsen T. E., Givskov M. & Tolker-Nielsen T. (2013). "Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **57**(5): 2352-2361. 10.1128/aac.00001-13

Chua S. L., Yam J. K., Hao P., Adav S. S., Salido M. M., Liu Y., Givskov M., Sze S. K., Tolker-Nielsen T. & Yang L. (2016). "Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Nat Commun **7**: 10750. 10.1038/ncomms10750

Cibulski S. (2016). "Untersuchung von wildlebenden Kleinsäugetieren und Wasserproben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Cibulski S. & Wollanke B. (2016). "Untersuchungen von wildlebenden Kleinsäugetieren und Wasserproben von Pferdebetrieben auf DNA pathogener Leptospiren mittels real-time PCR." Pferdeheilkunde **32**(6): 634-640. 10.21836/PEM20160608

Cielewicz M. B. (2014). "Histologische Untersuchungen von an Glaukom erkrankten Pferdeäugen." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Clutterbuck A., Woods E., Knottenbelt D., Clegg P., Cochrane C. & Percival S. (2007). "Biofilms and their relevance to veterinary medicine." Veterinary microbiology **121**(1-2): 1-17.

Cochrane C. A., Freeman K., Woods E., Welsby S. & Percival S. L. (2009). "Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds." Canadian journal of microbiology **55**(2): 197-202.

Colvin K. M., Gordon V. D., Murakami K., Borlee B. R., Wozniak D. J., Wong G. C. & Parsek M. R. (2011). "The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS Pathog **7**(1): e1001264. 10.1371/journal.ppat.1001264

Conlon B. P., Nakayasu E. S., Fleck L. E., LaFleur M. D., Isabella V. M., Coleman K., Leonard S. N., Smith R. D., Adkins J. N. & Lewis K. (2013). "Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection." Nature **503**(7476): 365-370. 10.1038/nature12790

Conway S., Balfour-Lynn I. M., De Rijcke K., Drevinek P., Foweraker J., Havermans T., Heijerman H., Lannefors L., Lindblad A., Macek M., Madge S., Moran M., Morrison L., Morton A., Noordhoek J., Sands D., Vertommen A. & Peckham D. (2014). "European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre." J Cyst Fibros **13 Suppl 1**: S3-22. 10.1016/j.jcf.2014.03.009

Costa D., Girardot M., Bertaux J., Verdon J. & Imbert C. (2016). "Efficacy of dental unit waterlines disinfectants on a polymicrobial biofilm." Water Res **91**: 38-44. 10.1016/j.watres.2015.12.053

Costa J. C., Espeschit Ide F., Pieri F. A., Benjamin Ldos A. & Moreira M. A. (2012). "Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin." Vet Microbiol **160**(3-4): 488-490. 10.1016/j.vetmic.2012.05.036

Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M. & Marrie T. J. (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464. 10.1146/annurev.mi.41.100187.002251

Costerton J. W., Geesey G. G. & Cheng K. J. (1978). "How bacteria stick." Sci Am **238**(1): 86-95. 10.1038/scientificamerican0178-86

Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. & Lappin-Scott H. M. (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745. 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

Costerton J. W., Post J. C., Ehrlich G. D., Hu F. Z., Kreft R., Nistico L., Kathju S., Stoodley P., Hall-Stoodley L., Maale G., James G., Sotereanos N. & DeMeo P. (2011). "New methods for the detection of orthopedic and other biofilm infections." FEMS Immunol Med Microbiol **61**(2): 133-140. 10.1111/j.1574-695X.2010.00766.x

Costerton J. W., Stewart P. S. & Greenberg E. P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322. 10.1126/science.284.5418.1318

Costerton W., Veeh R., Shirtliff M., Pasmore M., Post C. & Ehrlich G. (2003). "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections." J Clin Invest **112**(10): 1466-1477. 10.1172/jci20365

Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. & Penades J. R. (2001). "Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation." J Bacteriol **183**(9): 2888-2896. 10.1128/jb.183.9.2888-2896.2001

Dalton T., Dowd S. E., Wolcott R. D., Sun Y., Watters C., Griswold J. A. & Rumbaugh K. P. (2011). "An in vivo polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions." PLoS One **6**(11): e27317. 10.1371/journal.pone.0027317

Darouiche R. O., Mansouri M. D., Gawande P. V. & Madhyastha S. (2009). "Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB combination." J Antimicrob Chemother **64**(1): 88-93. 10.1093/jac/dkp158

Das T., Krom B. P., van der Mei H. C., Busscher H. J. & Sharma P. K. (2011). "DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid–base interactions." Soft Matter **7**(6): 2927-2935. 10.1039/C0SM01142H

Das T., Sehar S. & Manefield M. (2013). "The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development." Environ Microbiol Rep **5**(6): 778-786. 10.1111/1758-2229.12085

Davies C. E., Hill K. E., Newcombe R. G., Stephens P., Wilson M. J., Harding K. G. & Thomas D. W. (2007). "A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs." Wound Repair Regen **15**(1): 17-22. 10.1111/j.1524-475X.2006.00180.x

Davis S. C., Ricotti C., Cazzaniga A., Welsh E., Eaglstein W. H. & Mertz P. M. (2008). "Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound

colonization in vivo." Wound Repair Regen **16**(1): 23-29. 10.1111/j.1524-475X.2007.00303.x

de Jong P. A., Nakano Y., Lequin M. H., Mayo J. R., Woods R., Paré P. D. & Tiddens H. A. (2004). "Progressive damage on high resolution computed tomography despite stable lung function in cystic fibrosis." Eur Respir J **23**(1): 93-97. 10.1183/09031936.03.00006603

de la Fuente-Núñez C., Korolik V., Bains M., Nguyen U., Breidenstein E. B., Horsman S., Lewenza S., Burrows L. & Hancock R. E. (2012). "Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide." Antimicrob Agents Chemother **56**(5): 2696-2704. 10.1128/aac.00064-12

de la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Haney E. F., Straus S. K. & Hancock R. E. (2014). "Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response." PLoS Pathog **10**(5): e1004152. 10.1371/journal.ppat.1004152

de Vos W. M. (2015). "Microbial biofilms and the human intestinal microbiome." NPJ Biofilms Microbiomes **1**: 15005. 10.1038/npjbiofilms.2015.5

Deeg C., Ehrenhofer M., Thureau S., Reese S., Wildner G. & Kaspers B. (2002). "Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses." Experimental eye research **75**(2): 127-133.

Deeg C. A. (2008). "Ocular immunology in equine recurrent uveitis." Vet Ophthalmol **11**(1): 61-65. 10.1111/j.1463-5224.2008.00625.x

Deeg C. A., Kaspers B., Gerhards H., Thureau S. R., Wollanke B. & Wildner G. (2001). "Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(2): 393-398.

Deeg C. A., Marti E., Gaillard C. & Kaspers B. (2004). "Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9." Equine Vet J **36**(1): 73-75. 10.2746/0425164044864651

Deeg C. A., Thureau S. R., Gerhards H., Ehrenhofer M., Wildner G. & Kaspers B. (2002). "Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease." Eur J Immunol **32**(9): 2598-2606. 10.1002/1521-4141(200209)32:9<2598::Aid-immu2598>3.0.Co;2-#

del Amo E. M. & Urtti A. (2015). "Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data." Experimental eye research **137**: 111-124. 10.1016/j.exer.2015.05.003

Del Pozo J. L. (2018). "Biofilm-related disease." Expert Rev Anti Infect Ther **16**(1): 51-65. 10.1080/14787210.2018.1417036

Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R., Collatz E. & Courvalin P. (2007). "Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression." Clin Microbiol Rev **20**(1): 79-114. 10.1128/cmr.00015-06

Deretic V., Govan J. R., Konyecsni W. M. & Martin D. W. (1990). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the muc loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli." Mol Microbiol **4**(2): 189-196. 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00586.x

Diegelmann R. F. (2003). "Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers." Wound Repair Regen **11**(6): 490-495. 10.1046/j.1524-475x.2003.11617.x

Diggle S. P., Stacey R. E., Dodd C., Camara M., Williams P. & Winzer K. (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **8**(6): 1095-1104. 10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x

Donaldson S. H. & Boucher R. C. (2003). "Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." Curr Opin Pulm Med **9**(6): 486-491. 10.1097/00063198-200311000-00007

Donlan R. M. & Costerton J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193. 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002

Döring G. (1997). "Cystic fibrosis respiratory infections: interactions between bacteria and host defence." Monaldi Arch Chest Dis **52**(4): 363-366.

Döring G., Conway S. P., Heijerman H. G., Hodson M. E., Høiby N., Smyth A. & Touw D. J. (2000). "Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus." Eur Respir J **16**(4): 749-767. 10.1034/j.1399-3003.2000.16d30.x

Döring G. & Hoiby N. (2004). "Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus." J Cyst Fibros **3**(2): 67-91. 10.1016/j.jcf.2004.03.008

Doroshenko N., Tseng B. S., Howlin R. P., Deacon J., Wharton J. A., Thurner P. J., Gilmore B. F., Parsek M. R. & Stoodley P. (2014). "Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin." Antimicrob Agents Chemother **58**(12): 7273-7282. 10.1128/aac.03132-14

Dow G., Browne A. & Sibbald R. G. (1999). "Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment." Ostomy Wound Manage **45**(8): 23-27, 29-40; quiz 41-22.

Dowd S. E., Sun Y., Secor P. R., Rhoads D. D., Wolcott B. M., James G. A. & Wolcott R. D. (2008). "Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing." BMC Microbiology **8**(1): 43. 10.1186/1471-2180-8-43

Dowsett C. (2013). "Biofilms: A practice-based approach to identification and treatment." Wounds UK **9**(2).

Drenkard E. & Ausubel F. M. (2002). "Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation." Nature **416**(6882): 740-743. 10.1038/416740a

Driffield K., Miller K., Bostock J. M., O'Neill A. J. & Chopra I. (2008). "Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms." J Antimicrob Chemother **61**(5): 1053-1056. 10.1093/jac/dkn044

Dubielzig R. R. R., J. A.; Morreale, R. J. (1997). "Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis." Veterinary & Comparative Ophthalmology **7**(3): 163-167.

Dunne W. M., Jr., Mason E. O., Jr. & Kaplan S. L. (1993). "Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm." Antimicrob Agents Chemother **37**(12): 2522-2526. 10.1128/aac.37.12.2522

Dwyer D. J., Collins J. J. & Walker G. C. (2015). "Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality." Annu Rev Pharmacol Toxicol **55**: 313-332. 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124712

Eigen H., Rosenstein B. J., FitzSimmons S. & Schidlow D. V. (1995). "A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group." J Pediatr **126**(4): 515-523. 10.1016/s0022-3476(95)70343-8

Elias S. & Banin E. (2012). "Multi-species biofilms: living with friendly neighbors." FEMS Microbiol Rev **36**(5): 990-1004. 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x

Elkins M. R., Robinson M., Rose B. R., Harbour C., Moriarty C. P., Marks G. B., Belousova E. G., Xuan W. & Bye P. T. (2006). "A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis." N Engl J Med **354**(3): 229-240. 10.1056/NEJMoa043900

Ellis W. A. (2015). "Animal leptospirosis." Curr Top Microbiol Immunol **387**: 99-137. 10.1007/978-3-662-45059-8_6

Evans D. J., Allison D. G., Brown M. R. & Gilbert P. (1991). "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin:

effect of specific growth rate." J Antimicrob Chemother **27**(2): 177-184.
10.1093/jac/27.2.177

Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L. & Henson P. M. (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol **148**(7): 2207-2216.

Feres M., Teles F., Teles R., Figueiredo L. C. & Faveri M. (2016). "The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth." Periodontol 2000 **72**(1): 30-53.
10.1111/prd.12136

Ferris R. A., McCue P. M., Borlee G. I., Loncar K. D., Hennet M. L. & Borlee B. R. (2016). "In Vitro Efficacy of Nonantibiotic Treatments on Biofilm Disruption of Gram-Negative Pathogens and an In Vivo Model of Infectious Endometritis Utilizing Isolates from the Equine Uterus." J Clin Microbiol **54**(3): 631-639.
10.1128/jcm.02861-15

Fingerhut L., Ohnesorge B., von Borstel M., Schumski A., Strutzberg-Minder K., Mörgelin M., Deeg C. A., Haagsman H. P., Beineke A., von Köckritz-Blickwede M. & de Buhr N. (2019). "Neutrophil Extracellular Traps in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis (ERU)." Cells **8**(12). 10.3390/cells8121528

Fischer B. M., McMullen R. J., Jr., Reese S. & Brehm W. (2019). "Intravitreal injection of low-dose gentamicin for the treatment of recurrent or persistent uveitis in horses: Preliminary results." BMC Vet Res **15**(1): 29. 10.1186/s12917-018-1722-7

Flemming H.-C. & Wingender J. (2001). "Biofilme — die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme." Biologie in unserer Zeit **31**(3): 169-180. 10.1002/1521-415x(200105)31:3<169::Aid-biuz169>3.0.Co;2-u

Fong J. N. C. & Yildiz F. H. (2015). "Biofilm Matrix Proteins." Microbiol Spectr **3**(2). 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014

Foweraker J. E., Laughton C. R., Brown D. F. & Bilton D. (2005). "Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing." J Antimicrob Chemother **55**(6): 921-927. 10.1093/jac/dki146

Fox S., Leitch A. E., Duffin R., Haslett C. & Rossi A. G. (2010). "Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease." J Innate Immun **2**(3): 216-227. 10.1159/000284367

Frederiksen B., Pressler T., Hansen A., Koch C. & Høiby N. (2006). "Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis." Acta Paediatr **95**(9): 1070-1074. 10.1080/08035250600752466

Frellstedt L. (2009). "Equine recurrent uveitis: A clinical manifestation of leptospirosis." Equine Veterinary Education **21**(10): 546-552. 10.2746/095777309x467853

Frühauf B., Ohnesorge B., Deegen E. & Boevé M. (1998). "Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy." Vet Ophthalmol **1**(2-3): 137-151. 10.1046/j.1463-5224.1998.00030.x

Fuchs H. J., Borowitz D. S., Christiansen D. H., Morris E. M., Nash M. L., Ramsey B. W., Rosenstein B. J., Smith A. L. & Wohl M. E. (1994). "Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group." N Engl J Med **331**(10): 637-642. 10.1056/nejm199409083311003

Gemmell E., Marshall R. I. & Seymour G. J. (1997). "Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease." Periodontol **2000** **14**: 112-143. 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00194.x

Gerhards H. & Wollanke B. (2001). "Uveitis bei Pferden – Diagnose und Therapie." Pferdeheilkunde **17**: 319-329. 10.21836/PEM20010402

Gerhards H. & Wollanke B. (2005). Surgical treatment of equine recurrent uveitis: Trans-pars-plana vitrectomy in horses. In: Equine Ophthalmology, 1st edition, Gilger, B. (Hrsg.): 314-319.

Gerhards H., Wollanke B. & Brem S. (1999). "Vitrectomy as a diagnostic and therapeutic approach for equine recurrent uveitis (ERU)." Proceedings 45th Ann. Conv. AAEP (2000) **45**: 89-93.

Gesell S. (2004). "Gibt es eine asymptomatische intraokulare Leptospireninfektion beim Pferd?" Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Gibson R. L., Burns J. L. & Ramsey B. W. (2003). "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 918-951. 10.1164/rccm.200304-505SO

Gilger B. & Deeg C. (2011). Equine Recurrent Uveitis. Equine Ophthalmology, 2nd edition, Gilger, B. (Hrsg.): 317-349. 10.1016/B978-1-4377-0846-2.00008-2

Gilger B. C. (2010). "Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA." Equine Vet J Suppl(37): 57-61. 10.1111/j.2042-3306.2010.tb05636.x

Gilger B. C., Malok E., Cutter K. V., Stewart T., Horohov D. W. & Allen J. B. (1999). "Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis." Vet Immunol Immunopathol **71**(1): 17-28. 10.1016/s0165-2427(99)00082-3

Gilger B. C. & Michau T. M. (2004). "Equine recurrent uveitis: new methods of management." Vet Clin North Am Equine Pract **20**(2): 417-427, vii. 10.1016/j.cveq.2004.04.010

Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P. D. & Kjelleberg S. (1996). "Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling." J Bacteriol **178**(22): 6618-6622. 10.1128/jb.178.22.6618-6622.1996

Giwerzman B., Jensen E. T., Høiby N., Kharazmi A. & Costerton J. W. (1991). "Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm." Antimicrob Agents Chemother **35**(5): 1008-1010. 10.1128/aac.35.5.1008

Goldstein S. F. & Charon N. W. (1988). "Motility of the spirochete *Leptospira*." Cell Motil Cytoskeleton **9**(2): 101-110. 10.1002/cm.970090202

Goltermann L. & Tolker-Nielsen T. (2017). "Importance of the Exopolysaccharide Matrix in Antimicrobial Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates." Antimicrob Agents Chemother **61**(4). 10.1128/aac.02696-16

Gomes F., Saavedra M. J. & Henriques M. (2016). "Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms." Pathog Dis **74**(3). 10.1093/femspd/ftw006

Goodman S. D., Obergfell K. P., Jurgisek J. A., Novotny L. A., Downey J. S., Ayala E. A., Tjokro N., Li B., Justice S. S. & Bakaletz L. O. (2011). "Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins." Mucosal Immunology **4**(6): 625-637. 10.1038/mi.2011.27

Gotz F. (2002). "Staphylococcus and biofilms." Mol Microbiol **43**(6): 1367-1378. 10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x

Guzik K., Bzowska M., Smagur J., Krupa O., Sieprawska M., Travis J. & Potempa J. (2007). "A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages." Cell Death Differ **14**(1): 171-182. 10.1038/sj.cdd.4401927

Haake D. A. & Levett P. N. (2015). "Leptospirosis in humans." Curr Top Microbiol Immunol **387**: 65-97. 10.1007/978-3-662-45059-8_5

Hall C. W. & Mah T. F. (2017). "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria." FEMS Microbiol Rev **41**(3): 276-301. 10.1093/femsre/fux010

Hall-Stoodley L. & Stoodley P. (2009). "Evolving concepts in biofilm infections." Cell Microbiol **11**(7): 1034-1043. 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x

Hall-Stoodley L., Stoodley P., Kathju S., Høiby N., Moser C., Costerton J. W., Moter A. & Bjarnsholt T. (2012). "Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections." FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 127-145. 10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x

Handwerger S. & Tomasz A. (1985). "Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria." Annu Rev Pharmacol Toxicol **25**: 349-380. 10.1146/annurev.pa.25.040185.002025

Harrison J. J., Wade W. D., Akierman S., Vacchi-Suzzi C., Stremick C. A., Turner R. J. & Ceri H. (2009). "The chromosomal toxin gene yafQ is a determinant of multidrug tolerance for Escherichia coli growing in a biofilm." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2253-2258. 10.1128/aac.00043-09

Hartskeerl R. A., Goris M. G., Brem S., Meyer P., Kopp H., Gerhards H. & Wollanke B. (2004). "Classification of leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **51**(3): 110-115. 10.1111/j.1439-0450.2004.00740.x

Hatch R. A. & Schiller N. L. (1998). "Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid Pseudomonas aeruginosa." Antimicrob Agents Chemother **42**(4): 974-977. 10.1128/aac.42.4.974

Hay I. D., Gatland K., Campisano A., Jordens J. Z. & Rehm B. H. (2009). "Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid Pseudomonas aeruginosa strain." Appl Environ Microbiol **75**(18): 6022-6025. 10.1128/aem.01078-09

Hazan R., Que Y. A., Maura D., Strobel B., Majcherczyk P. A., Hopper L. R., Wilbur D. J., Hreha T. N., Barquera B. & Rahme L. G. (2016). "Auto Poisoning of the Respiratory Chain by a Quorum-Sensing-Regulated Molecule Favors Biofilm Formation and Antibiotic Tolerance." Curr Biol **26**(2): 195-206. 10.1016/j.cub.2015.11.056

Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T. B., Heydorn A., Andersen J. B., Parsek M. R., Rice S. A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S. & Givskov M. (2002). "Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound." Microbiology **148**(Pt 1): 87-102. 10.1099/00221287-148-1-87

Hentzer M., Teitzel G. M., Balzer G. J., Heydorn A., Molin S., Givskov M. & Parsek M. R. (2001). "Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function." J Bacteriol **183**(18): 5395-5401. 10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001

Heukelekian H. & Heller A. (1940). "Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth." J Bacteriol **40**(4): 547-558. 10.1128/JB.40.4.547-558.1940

Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S. & Ciofu O. (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." Int J Antimicrob Agents **35**(4): 322-332. 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

Hoiby N., Bjarnsholt T., Moser C., Bassi G. L., Coenye T., Donelli G., Hall-Stoodley L., Hola V., Imbert C., Kirketerp-Møller K., Lebeaux D., Oliver A., Ullmann A. J. & Williams C. (2015). "ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014." Clin Microbiol Infect **21** Suppl 1: S1-25. 10.1016/j.cmi.2014.10.024

Høiby N., Ciofu O. & Bjarnsholt T. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis." Future Microbiol **5**(11): 1663-1674. 10.2217/fmb.10.125

Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z. j., Moser C., Jensen P. Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. & Bjarnsholt T. (2011). "The clinical impact of bacterial biofilms." International journal of oral science **3**(2): 55-65.

Huseby M. J., Kruse A. C., Digre J., Kohler P. L., Vocke J. A., Mann E. E., Bayles K. W., Bohach G. A., Schlievert P. M., Ohlendorf D. H. & Earhart C. A. (2010). "Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal

biofilms." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14407-14412.
10.1073/pnas.0911032107

Imlay J. A. (2013). "The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium." Nat Rev Microbiol **11**(7): 443-454. 10.1038/nrmicro3032

Ito T. & Yanagawa R. (1987). "Leptospiral attachment to four structural components of extracellular matrix." Nihon Juigaku Zasshi **49**(5): 875-882.
10.1292/jvms1939.49.875

Jahoor A., Patel R., Bryan A., Do C., Krier J., Watters C., Wahli W., Li G., Williams S. C. & Rumbaugh K. P. (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer." J Bacteriol **190**(13): 4408-4415. 10.1128/jb.01444-07

Jakubovics N. S., Shields R. C., Rajarajan N. & Burgess J. G. (2013). "Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms." Lett Appl Microbiol **57**(6): 467-475. 10.1111/lam.12134

Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., Hussain T., Ali M., Rafiq M. & Kamil M. A. (2018). "Bacterial biofilm and associated infections." J Chin Med Assoc **81**(1): 7-11. 10.1016/j.jcma.2017.07.012

James G. A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini E., Secor P., Sestrich J., Costerton J. W. & Stewart P. S. (2008). "Biofilms in chronic wounds." Wound Repair Regen **16**(1): 37-44. 10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x

Jennings L. K., Storek K. M., Ledvina H. E., Coulon C., Marmont L. S., Sadovskaya I., Secor P. R., Tseng B. S., Scian M., Filloux A., Wozniak D. J., Howell P. L. & Parsek M. R. (2015). "Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(36): 11353-11358. 10.1073/pnas.1503058112

Jensen E. T., Kharazmi A., Garred P., Kronborg G., Fomsgaard A., Mollnes T. E. & Høiby N. (1993). "Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Microb Pathog **15**(5): 377-388. 10.1006/mpat.1993.1087

Jensen P., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T. B., Calum H., Christoffersen L., Moser C., Williams P., Pressler T., Givskov M. & Høiby N. (2007). "Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **153**(Pt 5): 1329-1338. 10.1099/mic.0.2006/003863-0

Jensen P., Briaies A., Brochmann R. P., Wang H., Kragh K. N., Kolpen M., Hempel C., Bjarnsholt T., Høiby N. & Ciofu O. (2014). "Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Pathog Dis **70**(3): 440-443. 10.1111/2049-632x.12120

Jesaitis A. J., Franklin M. J., Berglund D., Sasaki M., Lord C. I., Bleazard J. B., Duffy J. E., Beyenal H. & Lewandowski Z. (2003). "Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions." J Immunol **171**(8): 4329-4339. 10.4049/jimmunol.171.8.4329

Johnson L., Mulcahy H., Kanevets U., Shi Y. & Lewenza S. (2012). "Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress." J Bacteriol **194**(4): 813-826. 10.1128/jb.05230-11

Joo H. S. & Otto M. (2012). "Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens." Chem Biol **19**(12): 1503-1513. 10.1016/j.chembiol.2012.10.022

Kandeler E., Tscherko D., Bruce K. D., Stemmer M., Hobbs P. J., Bardgett R. D. & Amelung W. (2000). "Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil." Biology and Fertility of Soils **32**(5): 390-400. 10.1007/s003740000268

Kaplan J. B. (2009). "Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes." Int J Artif Organs **32**(9): 545-554. 10.1177/039139880903200903

Kaplan J. B., Izano E. A., Gopal P., Karwacki M. T., Kim S., Bose J. L., Bayles K. W. & Horswill A. R. (2012). "Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." mBio **3**(4): e00198-00112. 10.1128/mBio.00198-12

Karbysheva S., Di Luca M., Butini M. E., Winkler T., Schütz M. & Trampuz A. (2020). "Comparison of sonication with chemical biofilm dislodgement methods using chelating and reducing agents: Implications for the microbiological diagnosis of implant associated infection." PLoS One **15**(4): e0231389. 10.1371/journal.pone.0231389

Keast D., Swanson T., Carville K., Fletcher J., Schultz G. & Black J. (2014). "Ten top tips... Understanding and managing wound biofilm." Journal of Lymphoedema **5**: 20-24.

Khakimova M., Ahlgren H. G., Harrison J. J., English A. M. & Nguyen D. (2013). "The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance." J Bacteriol **195**(9): 2011-2020. 10.1128/jb.02061-12

Kinane D. F., Demuth D. R., Gorr S.-U., Hajishengallis G. N. & Martin M. H. (2007). "Human variability in innate immunity." Periodontology 2000 **45**: 14-34. 10.1111/j.1600-0757.2007.00220.x

Kinane D. F., Stathopoulou P. G. & Papapanou P. N. (2017). "Periodontal diseases." Nat Rev Dis Primers **3**: 17038. 10.1038/nrdp.2017.38

Kleinpeter A. G., Agnes; Köhler, Elisa; Brehm, Walter (2019). "Intravitreale Low-Dose-Gentamicininjektion zur Behandlung ERU-erkrankter Pferde." Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere **47(01)**: 25-34. 10.1055/a-0816-7156

Kline K. A., Fälker S., Dahlberg S., Normark S. & Henriques-Normark B. (2009). "Bacterial adhesins in host-microbe interactions." Cell Host Microbe **5**(6): 580-592. 10.1016/j.chom.2009.05.011

Koch C. (2002). "Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease." Pediatr Pulmonol **34**(3): 232-236. 10.1002/ppul.10135

Kristian S. A., Birkenstock T. A., Sauder U., Mack D., Götz F. & Landmann R. (2008). "Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing." J Infect Dis **197**(7): 1028-1035. 10.1086/528992

Kubik D.-C. A. (2007). "Biofilme als mögliche Indikatoren für Umweltbelastungen." Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität. Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät.

Kulbrock M. (2013). "Studie zu Häufigkeit und Schweregrad der Equinen Rezidivierenden Uveitis bei Warmblütern." Pferdeheilkunde **29**: 27-36.

Kwan B. W., Chowdhury N. & Wood T. K. (2015). "Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C." Environ Microbiol **17**(11): 4406-4414. 10.1111/1462-2920.12873

Lam J., Chan R., Lam K. & Costerton J. W. (1980). "Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis." Infect Immun **28**(2): 546-556.

Launois T., González Hilarión L. M., Barbe F., Leurquin C., Bihin B., Hontoir F., Dugdale A. & Vandeweerd J. M. (2019). "Use of Intravitreal Injection of Gentamicin in 71 Horses With Equine Recurrent Uveitis." J Equine Vet Sci **77**: 93-97. 10.1016/j.jevs.2019.02.018

LeBlanc M. M. (2010). "Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare." Reprod Domest Anim **45**(2): 21-27. 10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x

Lechtzin N., John M., Irizarry R., Merlo C., Diette G. B. & Boyle M. P. (2006). "Outcomes of adults with cystic fibrosis infected with antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." Respiration **73**(1): 27-33. 10.1159/000087686

Lee J. H., Park J. H., Cho H. S., Joo S. W., Cho M. H. & Lee J. (2013). "Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*." Biofouling **29**(5): 491-499. 10.1080/08927014.2013.788692

Leid J. G., Shirtliff M. E., Costerton J. W. & Stoodley P. (2002). "Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms." Infect Immun **70**(11): 6339-6345. 10.1128/iai.70.11.6339-6345.2002

Leid J. G., Willson C. J., Shirtliff M. E., Hassett D. J., Parsek M. R. & Jeffers A. K. (2005). "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." J Immunol **175**(11): 7512-7518. 10.4049/jimmunol.175.11.7512

Lewis K. (2001). "Riddle of biofilm resistance." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 999-1007. 10.1128/aac.45.4.999-1007.2001

Lewis K. (2008). "Multidrug tolerance of biofilms and persister cells." Curr Top Microbiol Immunol **322**: 107-131. 10.1007/978-3-540-75418-3_6

Linke R. P., Brandes K., Cielewicz M. B., Gerhards H. & Wollanke B. (2019). "Ocular leptospiral infection leads to ciliary induction and local AA-amyloidosis in horses." Amyloid **26**(sup1): 127-128. 10.1080/13506129.2019.1584100

Lister J. L. & Horswill A. R. (2014). "Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal." Front Cell Infect Microbiol **4**: 178. 10.3389/fcimb.2014.00178

Llewelyn M. & Cohen J. (2002). "Superantigens: microbial agents that corrupt immunity." Lancet Infect Dis **2**(3): 156-162. 10.1016/s1473-3099(02)00222-0

Lobritz M. A., Belenky P., Porter C. B., Gutierrez A., Yang J. H., Schwarz E. G., Dwyer D. J., Khalil A. S. & Collins J. J. (2015). "Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(27): 8173-8180. 10.1073/pnas.1509743112

Loibl J. (2009). "Immunologische und mikrobiologische Untersuchungen zur intraokular persistierenden Leptospireninfektion bei Pferden mit rezidivierender Uveitis." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Loibl J., Gerhards H., Brem S. & Wollanke B. (2018). "Verbesserung der Labordiagnostik der Leptospirenuveitis bei Pferden mittels Anwendung eines indirekten ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leptospira* spp. in intraokularen Proben." Pferdeheilkunde **34**(3): 267-277. 10.21836/PEM20180308

Lowe R. C. (2010). "Equine uveitis: a UK perspective." Equine Vet J Suppl(37): 46-49. 10.1111/j.2042-3306.2010.tb05634.x

Lu S., Xiang J., Qing C., Jin S., Liao Z. & Shi J. (2002). "Effect of necrotic tissue on progressive injury in deep partial thickness burn wounds." Chin Med J (Engl) **115**(3): 323-325.

Ma L., Jackson K. D., Landry R. M., Parsek M. R. & Wozniak D. J. (2006). "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment." J Bacteriol **188**(23): 8213-8221. 10.1128/jb.01202-06

Mahajan V. B. & Skeie J. M. (2014). "Translational vitreous proteomics." Proteomics Clin Appl **8**(3-4): 204-208. 10.1002/prca.201300062

Malone M., Bjarnsholt T., Cooper R., Fletcher J., Fromantin I., Kirketerp-Mølle K., Schultz G. & Wolcott R. (2016). "Position document: Management of biofilm." Wounds International.

Mandsberg L. F., Ciofu O., Kirkby N., Christiansen L. E., Poulsen H. E. & Høiby N. (2009). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2483-2491. 10.1128/aac.00428-08

Mann E. E., Rice K. C., Boles B. R., Endres J. L., Ranjit D., Chandramohan L., Tsang L. H., Smeltzer M. S., Horswill A. R. & Bayles K. W. (2009). "Modulation

of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation." PLoS One **4**(6): e5822. 10.1371/journal.pone.0005822

Marrie T. J., Nelligan J. & Costerton J. W. (1982). "A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead." Circulation **66**(6): 1339-1341. 10.1161/01.cir.66.6.1339

Mast B. A. & Schultz G. S. (1996). "Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds." Wound Repair Regen **4**(4): 411-420. 10.1046/j.1524-475X.1996.40404.x

Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P. W., Campbell J. I. A., Jensen P., Johnsen A. H., Givskov M., Ohman D. E., Søren M., Høiby N. & Kharazmi A. (1999). "Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung." Microbiology **145**(6): 1349-1357. 10.1099/13500872-145-6-1349

Mattie H. (2000). "Antibiotic efficacy in vivo predicted by in vitro activity." Int J Antimicrob Agents **14**(2): 91-98. 10.1016/s0924-8579(99)00145-4

McBride A. J., Athanazio D. A., Reis M. G. & Ko A. I. (2005). "Leptospirosis." Curr Opin Infect Dis **18**(5): 376-386. 10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c

McDermott W. (1958). "Microbial persistence." Yale J Biol Med **30**(4): 257-291.

Melchior M., Vaarkamp H. & Fink-Gremmels J. (2006). "Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?" The Veterinary Journal **171**(3): 398-407. 10.1016/j.tvjl.2005.01.006

Melchior M. B., Fink-Gremmels J. & Gaastra W. (2006). "Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **53**(7): 326-332. 10.1111/j.1439-0450.2006.00962.x

Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J., Solano C., Calvo E., Lopez J. A., Foster T. J., Penades J. R. & Lasa I. (2009). "Protein A-mediated

multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **191**(3): 832-843.
10.1128/jb.01222-08

Meyer K. C. & Sharma A. (1997). "Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **156**(5): 1536-1540.
10.1164/ajrccm.156.5.9701098

Milanov D., Lazic S., Vidić B., Petrović J., Bugarski D. & Seguljev Z. (2010). "Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates." Acta Veterinaria **60**. 10.2298/AVB1003217M

Monahan A. M., Callanan J. J. & Nally J. E. (2009). "Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis." Vet Pathol **46**(5): 792-799.
10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV

Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P. & Arciola C. R. (2011). "Extracellular DNA in biofilms." Int J Artif Organs **34**(9): 824-831.
10.5301/ijao.5000051

Mulcahy L. R., Isabella V. M. & Lewis K. (2014). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease." Microb Ecol **68**(1): 1-12. 10.1007/s00248-013-0297-x

Murray G. L. (2015). "The molecular basis of leptospiral pathogenesis." Curr Top Microbiol Immunol **387**: 139-185. 10.1007/978-3-662-45059-8_7

Müsken M., Klimmek K., Sauer-Heilborn A., Donnert M., Sedlacek L., Suerbaum S. & Häussler S. (2017). "Towards individualized diagnostics of biofilm-associated infections: a case study." NPJ Biofilms Microbiomes **3**: 22. 10.1038/s41522-017-0030-5

Mustoe T. A., O'Shaughnessy K. & Kloeters O. (2006). "Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis." Plast Reconstr Surg **117**(7): 35s-41s. 10.1097/01.prs.0000225431.63010.1b

Nagler M., Insam H., Pietramellara G. & Ascher-Jenull J. (2018). "Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications." Appl Microbiol Biotechnol **102**(15): 6343-6356. 10.1007/s00253-018-9120-4

Newton H., Edwards J., Mitchell L. & Percival S. L. (2017). "Role of slough and biofilm in delaying healing in chronic wounds." Br J Nurs **26**(20a): 4-11. 10.12968/bjon.2017.26.Sup20a.S4

Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B. E. & Singh P. K. (2011). "Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria." Science **334**(6058): 982-986. 10.1126/science.1211037

Nickel J. C., Ruseska I., Wright J. B. & Costerton J. W. (1985). "Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material." Antimicrob Agents Chemother **27**(4): 619-624. 10.1128/aac.27.4.619

Niedermaier G. (2002). "Elektronenmikroskopische Untersuchung des Glaskörpers des Pferdes mit equiner rezidivierender Uveitis." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Niedermaier G., Wollanke B., Hoffmann R., Matiasek K. & Gerhards H. (2006). "Darstellung der Glaskörperstruktur von augengesunden Pferden und von Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis (ERU) mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie." Dtsch Tierärztl Wochenschr. **113**(6): 211-217. PMID: 16856605

OIE (2018). "Leptospirosis." Terrestrial Manual. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf.

Okshevsky M. & Meyer R. L. (2015). "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms." Crit Rev Microbiol **41**(3): 341-352. 10.3109/1040841x.2013.841639

Okshevsky M., Regina V. R. & Meyer R. L. (2015). "Extracellular DNA as a target for biofilm control." Curr Opin Biotechnol **33**: 73-80. 10.1016/j.copbio.2014.12.002

Oliveira R., Domingos R. F., Siqueira G. H., Fernandes L. G., Souza N. M., Vieira M. L., de Moraes Z. M., Vasconcellos S. A. & Nascimento A. L. (2013). "Adhesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrin clot formation in vitro." PLoS Negl Trop Dis **7**(8): e2396. 10.1371/journal.pntd.0002396

Oliver A., Cantón R., Campo P., Baquero F. & Blázquez J. (2000). "High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection." Science **288**(5469): 1251-1254. 10.1126/science.288.5469.1251

Østevik L., de Souza G., Wien T., Gunnes G. & Sørby R. (2014). "Characterization of Amyloid in Equine Recurrent Uveitis as AA Amyloid." Journal of comparative pathology **152**. 10.1016/j.jcpa.2014.04.007

Otto M. (2009). "Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen." Nat Rev Microbiol **7**(8): 555-567. 10.1038/nrmicro2182

Otto M. (2013). "Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity." Annu Rev Med **64**: 175-188. 10.1146/annurev-med-042711-140023

Papa R. & Lachmann H. J. (2018). "Secondary, AA, Amyloidosis." Rheum Dis Clin North Am **44**(4): 585-603. 10.1016/j.rdc.2018.06.004

Papayannopoulos V. (2019). "Neutrophils Facing Biofilms: The Battle of the Barriers." Cell Host Microbe **25**(4): 477-479. 10.1016/j.chom.2019.03.014

Parsek M. R. & Singh P. K. (2003). "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis." Annu Rev Microbiol **57**: 677-701. 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720

Patel S., Maheshwari A. & Chandra A. (2016). "Biomarkers for wound healing and their evaluation." J Wound Care **25**(1): 46-55. 10.12968/jowc.2016.25.1.46

Pedersen S. S. (1992). "Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis." APMIS Suppl **28**: 1-79.

Penesyan A., Nagy S. S., Kjelleberg S., Gillings M. R. & Paulsen I. T. (2019). "Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics." npj Biofilms and Microbiomes **5**(1): 34. 10.1038/s41522-019-0108-3

Percival S. (2017). "Importance of biofilm formation in surgical infection." British Journal of Surgery **104**(2): 85-94. 10.1002/bjs.10433

Percival S. & Cutting K. (2010). The Microbiology of Wounds. S. 192. 10.1201/9781420079944-c6

Percival S. L., Hill K. E., Williams D. W., Hooper S. J., Thomas D. W. & Costerton J. W. (2012). "A review of the scientific evidence for biofilms in wounds." Wound Repair Regen **20**(5): 647-657. 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x

Percival S. L., Malic S., Cruz H. & Williams D. W. (2011). Introduction to Biofilms. Biofilms and Veterinary Medicine. S. Percival, D. Knottenbelt and C. Cochrane. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 41-68. 10.1007/978-3-642-21289-5_2

Percival S. L. & Suleman L. (2015). "Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing." J Wound Care **24**(11): 498, 500-493, 506-410. 10.12968/jowc.2015.24.11.498

Perez A. C., Pang B., King L. B., Tan L., Murrah K. A., Reimche J. L., Wren J. T., Richardson S. H., Ghandi U. & Swords W. E. (2014). "Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo." Pathog Dis **70**(3): 280-288. 10.1111/2049-632x.12129

Picardeau M. (2013). "Diagnosis and epidemiology of leptospirosis." Med Mal Infect **43**(1): 1-9. 10.1016/j.medmal.2012.11.005

Pier G. B., Coleman F., Grout M., Franklin M. & Ohman D. E. (2001). "Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis." Infect Immun **69**(3): 1895-1901. 10.1128/iai.69.3.1895-1901.2001

Poole K. (2007). "Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms." Ann Med **39**(3): 162-176. 10.1080/07853890701195262

Popp M. K. (2011). "Enrofloxacin im Glaskörper an Equiner rezidivierender Uveitis erkrankter Pferde." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Popp M. K., Gerhards H. & Wollanke B. (2013). "Enrofloxacin-konzentrationen im Glaskörper und im Serum an equiner rezidivierender Uveitis (ERU) erkrankter Pferde nach wiederholter intravenöser Verabreichung." Pferdeheilkunde **29**: 574-580. 10.21836/PEM20130501

Pressler T., Frederiksen B., Skov M., Garred P., Koch C. & Høiby N. (2006). "Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study." J Cyst Fibros **5**(1): 9-15. 10.1016/j.jcf.2005.11.002

Pressler T., Karpati F., Granström M., Knudsen P. K., Lindblad A., Hjelte L., Olesen H. V., Meyer P. & Høiby N. (2009). "Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods." J Cyst Fibros **8**(1): 37-42. 10.1016/j.jcf.2008.08.002

Proctor R. A., von Eiff C., Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M. & Peters G. (2006). "Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections." Nat Rev Microbiol **4**(4): 295-305. 10.1038/nrmicro1384

Proesmans M., Balinska-Miskiewicz W., Dupont L., Bossuyt X., Verhaegen J., Høiby N. & de Boeck K. (2006). "Evaluating the "Leeds criteria" for *Pseudomonas*

aeruginosa infection in a cystic fibrosis centre." European Respiratory Journal **27**(5): 937-943. 10.1183/09031936.06.00100805

Qin Z., Ou Y., Yang L., Zhu Y., Tolker-Nielsen T., Molin S. & Qu D. (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." Microbiology **153**(Pt 7): 2083-2092. 10.1099/mic.0.2007/006031-0

Raafat D., Otto M., Reppschläger K., Iqbal J. & Holtfreter S. (2019). "Fighting *Staphylococcus aureus* Biofilms with Monoclonal Antibodies." Trends Microbiol **27**(4): 303-322. 10.1016/j.tim.2018.12.009

Rajan S. & Saiman L. (2002). "Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis." Semin Respir Infect **17**(1): 47-56. 10.1053/srin.2002.31690

Ranieri M. R., Whitchurch C. B. & Burrows L. L. (2018). "Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials." Curr Opin Microbiol **45**: 164-169. 10.1016/j.mib.2018.07.006

Reichhardt C., Wong C., Passos da Silva D., Wozniak D. J. & Parsek M. R. (2018). "CdrA Interactions within the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Safeguard It from Proteolysis and Promote Cellular Packing." mBio **9**(5). 10.1128/mBio.01376-18

Resch A., Rosenstein R., Nerz C. & Gotz F. (2005). "Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2663-2676. 10.1128/aem.71.5.2663-2676.2005

Ristow P., Bourhy P., Kerneis S., Schmitt C., Prevost M. C., Lilenbaum W. & Picardeau M. (2008). "Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires." Microbiology **154**(Pt 5): 1309-1317. 10.1099/mic.0.2007/014746-0

Roberts A. E., Kragh K. N., Bjarnsholt T. & Diggle S. P. (2015). "The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection." J Mol Biol **427**(23): 3646-3661. 10.1016/j.jmb.2015.09.002

Roczek A. (2008). "Entwicklung einer quantitativen PCR zum Nachweis von DNA pathogener Leptospiren in Glaskörper- und Kammerwasserproben von Pferden." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Rodgers M., Zhan X. & O'Reilly E. (2006). "Small-scale domestic wastewater treatment using an alternating pumped sequencing batch biofilm reactor system." Bioprocess Biosyst Eng **28**(5): 323-330. 10.1007/s00449-005-0038-8

Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F., Horstkotte M. A., Knobloch J. K., Heilmann C., Herrmann M. & Mack D. (2005). "Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases." Mol Microbiol **55**(6): 1883-1895. 10.1111/j.1365-2958.2005.04515.x

Rollet C., Gal L. & Guzzo J. (2009). "Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in Pseudomonas aeruginosa." FEMS Microbiol Lett **290**(2): 135-142. 10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x

Romeike A., Brüggmann M. & Drommer W. (1998). "Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU)." Vet Pathol **35**(6): 515-526. 10.1177/030098589803500606

Römling U., Galperin M. Y. & Gomelsky M. (2013). "Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger." Microbiol Mol Biol Rev **77**(1): 1-52. 10.1128/mmbr.00043-12

Ross K. R., Chmiel J. F. & Konstan M. W. (2009). "The role of inhaled corticosteroids in the management of cystic fibrosis." Paediatr Drugs **11**(2): 101-113. 10.2165/00148581-200911020-00002

Roth T. (2013). "Histologische Untersuchungen des Glaskörpers bei an equiner rezidivierender Uveitis erkrankten Pferden." Dissertation, LMU München.

Roth T., Brandes K., Gerhards H., Giving E. & Wollanke B. (2014). "Histologische Untersuchungen des Glaskörpers bei Pferden mit equiner rezidivierender Uveitis." Pferdeheilkunde **30**: 512-520. 10.21836/PEM20140501

Ryder C., Byrd M. & Wozniak D. J. (2007). "Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Curr Opin Microbiol **10**(6): 644-648. 10.1016/j.mib.2007.09.010

Ryder V. J., Chopra I. & O'Neill A. J. (2012). "Increased mutability of *Staphylococci* in biofilms as a consequence of oxidative stress." PLoS One **7**(10): e47695. 10.1371/journal.pone.0047695

Sadovskaya I., Vinogradov E., Flahaut S., Kogan G. & Jabbouri S. (2005). "Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A." Infect Immun **73**(5): 3007-3017. 10.1128/iai.73.5.3007-3017.2005

Sambanthamoorthy K., Sloup R. E., Parashar V., Smith J. M., Kim E. E., Semmelhack M. F., Neiditch M. B. & Waters C. M. (2012). "Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation." Antimicrob Agents Chemother **56**(10): 5202-5211. 10.1128/aac.01396-12

Savage V. J., Chopra I. & O'Neill A. J. (2013). "*Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance." Antimicrob Agents Chemother **57**(4): 1968-1970. 10.1128/aac.02008-12

Schaeffer C. R., Woods K. M., Longo G. M., Kiedrowski M. R., Paharik A. E., Buttner H., Christner M., Boissy R. J., Horswill A. R., Rohde H. & Fey P. D. (2015). "Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model." Infect Immun **83**(1): 214-226. 10.1128/iai.02177-14

Schaible B., Taylor C. T. & Schaffer K. (2012). "Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of

multidrug efflux pumps." Antimicrob Agents Chemother **56**(4): 2114-2118. 10.1128/aac.05574-11

Schinagl C. (2017). "Pars-Plana-Vitrektomie bei Equiner Rezidivierender Uveitis." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Schooling S. R. & Beveridge T. J. (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." J Bacteriol **188**(16): 5945-5957. 10.1128/jb.00257-06

Schultz D. R. & Miller K. D. (1974). "Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors." Infect Immun **10**(1): 128-135. 10.1128/iai.10.1.128-135.1974

Seneviratne C. J., Zhang C. F. & Samaranayake L. P. (2011). "Dental plaque biofilm in oral health and disease." Chin J Dent Res **14**(2): 87-94.

Seth A. K., Nguyen K. T., Geringer M. R., Hong S. J., Leung K. P., Mustoe T. A. & Galiano R. D. (2013). "Noncontact, low-frequency ultrasound as an effective therapy against *Pseudomonas aeruginosa*-infected biofilm wounds." Wound Repair Regen **21**(2): 266-274. 10.1111/wrr.12000

Shikari H. & Samant P. (2016). "Intravitreal injections: A review of pharmacological agents and techniques." Journal of Clinical Ophthalmology and Research **4**(1): 51-59. 10.4103/2320-3897.174429

Singh R., Ray P., Das A. & Sharma M. (2009). "Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study." J Med Microbiol **58**(Pt 8): 1067-1073. 10.1099/jmm.0.009720-0

Singh R., Ray P., Das A. & Sharma M. (2010). "Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." J Antimicrob Chemother **65**(9): 1955-1958. 10.1093/jac/dkq257

Skindersoe M. E., Alhede M., Phipps R., Yang L., Jensen P. O., Rasmussen T. B., Bjarnsholt T., Tolker-Nielsen T., Høiby N. & Givskov M. (2008). "Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3648-3663. 10.1128/aac.01230-07

Smith A. L., Fiel S. B., Mayer-Hamblett N., Ramsey B. & Burns J. L. (2003). "Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis." Chest **123**(5): 1495-1502. 10.1378/chest.123.5.1495

Smith W. D., Bardin E., Cameron L., Edmondson C. L., Farrant K. V., Martin I., Murphy R. A., Soren O., Turnbull A. R., Wierre-Gore N., Alton E. W., Bundy J. G., Bush A., Connett G. J., Faust S. N., Filloux A., Freemont P. S., Jones A. L., Takats Z., Webb J. S., Williams H. D. & Davies J. C. (2017). "Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis." FEMS Microbiol Lett **364**(14). 10.1093/femsle/fnx121

Sorsa T., Gursoy U. K., Nwhator S., Hernandez M., Tervahartiala T., Leppilahti J., Gursoy M., Könönen E., Emingil G., Pussinen P. J. & Mäntylä P. (2016). "Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases." Periodontol 2000 **70**(1): 142-163. 10.1111/prd.12101

Speziale P., Pietrocola G., Foster T. J. & Geoghegan J. A. (2014). "Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*." Front Cell Infect Microbiol **4**: 171. 10.3389/fcimb.2014.00171

Stadelmann W. K., Digenis A. G. & Tobin G. R. (1998). "Impediments to wound healing." Am J Surg **176**(2A Suppl): 39s-47s. 10.1016/s0002-9610(98)00184-6

Stangl W. (2020). "Online Lexikon für Psychologie und Pädagogik, Stichwort „Mikrobiom“." <https://lexikon.stangl.eu/13513/mikrobiom/>.

Stewart P. S. (1996). "Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms." Antimicrob Agents Chemother **40**(11): 2517-2522. 10.1128/aac.40.11.2517

Stewart P. S. (2015). "Antimicrobial Tolerance in Biofilms." Microbiol Spectr **3**(3). 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014

Stewart P. S. (2015). "Prospects for Anti-Biofilm Pharmaceuticals." Pharmaceuticals (Basel) **8**(3): 504-511. 10.3390/ph8030504

Stewart P. S., Davison W. M. & Steenbergen J. N. (2009). "Daptomycin rapidly penetrates a Staphylococcus epidermidis biofilm." Antimicrob Agents Chemother **53**(8): 3505-3507. 10.1128/aac.01728-08

Stewart P. S. & Franklin M. J. (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms." Nat Rev Microbiol **6**(3): 199-210. 10.1038/nrmicro1838

Stewart P. S., Zhang T., Xu R., Pitts B., Walters M. C., Roe F., Kikhney J. & Moter A. (2016). "Reaction–diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections." npj Biofilms and Microbiomes **2**(1): 16012. 10.1038/npjbiofilms.2016.12

Stone G., Wood P., Dixon L., Keyhan M. & Matin A. (2002). "Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic Escherichia coli biofilms." Antimicrob Agents Chemother **46**(8): 2458-2461. 10.1128/aac.46.8.2458-2461.2002

Strugeon E., Tilloy V., Ploy M. C. & Da Re S. (2016). "The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms." mBio **7**(4). 10.1128/mBio.00868-16

Stuart B., Lin J. H. & Mogayzel P. J., Jr. (2010). "Early eradication of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis." Paediatr Respir Rev **11**(3): 177-184. 10.1016/j.prrv.2010.05.003

Suci P. A., Mittelman M. W., Yu F. P. & Geesey G. G. (1994). "Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms." Antimicrob Agents Chemother **38**(9): 2125-2133. 10.1128/aac.38.9.2125

Sutherland I. (2001). "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology **147**(Pt 1): 3-9. 10.1099/00221287-147-1-3

Sutherland I. W. (2001). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends Microbiol **9**(5): 222-227. 10.1016/s0966-842x(01)02012-1

Szemes P. & Gerhards H. (2000). "Untersuchungen zur Prävalenz der equinen rezidivierenden Uveitis im Großraum Köln-Bonn." Der Praktische Tierarzt **81**: 414.

Tashiro Y., Nomura N., Nakao R., Senpuku H., Kariyama R., Kumon H., Kosono S., Watanabe H., Nakajima T. & Uchiyama H. (2008). "Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **190**(11): 3969-3978. 10.1128/jb.02004-07

Tata M., Wolfinger M. T., Amman F., Roschanski N., Dötsch A., Sonnleitner E., Häussler S. & Bläsi U. (2016). "RNASeq Based Transcriptional Profiling of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 after Short- and Long-Term Anoxic Cultivation in Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Medium." PLoS One **11**(1): e0147811. 10.1371/journal.pone.0147811

Thurlow L. R., Hanke M. L., Fritz T., Angle A., Aldrich A., Williams S. H., Engebretsen I. L., Bayles K. W., Horswill A. R. & Kielian T. (2011). "Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo." J Immunol **186**(11): 6585-6596. 10.4049/jimmunol.1002794

Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F. & Jaeger K. E. (2005). "Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." Microbiology **151**(Pt 5): 1313-1323. 10.1099/mic.0.27701-0

Tóth J. H., Josef; Huskamp, Bernhard (2006). "Spezielle Indikationen zur Vitrektomie beim Pferd." Pferdeheilkunde **22**: 296-300.

Trampuz A., Piper K. E., Jacobson M. J., Hanssen A. D., Unni K. K., Osmon D. R., Mandrekar J. N., Cockerill F. R., Steckelberg J. M., Greenleaf J. F. & Patel R. (2007). "Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection." N Engl J Med **357**(7): 654-663. 10.1056/NEJMoa061588

Tremblay Y. D. N., Labrie J., Chénier S. & Jacques M. (2017). "Actinobacillus pleuropneumoniae grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our in vitro biofilm assays?" Microb Biotechnol **10**(4): 756-760. 10.1111/1751-7915.12432

Tseng B. S., Zhang W., Harrison J. J., Quach T. P., Song J. L., Penterman J., Singh P. K., Chopp D. L., Packman A. I. & Parsek M. R. (2013). "The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin." Environ Microbiol **15**(10): 2865-2878. 10.1111/1462-2920.12155

Tsuchimoto M., Niikura M., Ono E., Kida H. & Yanagawa R. (1984). "Leptospiral attachment to cultured cells." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **258**(2-3): 268-274. 10.1016/s0176-6724(84)80044-9

Tuomanen E., Cozens R., Tosch W., Zak O. & Tomasz A. (1986). "The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth." J Gen Microbiol **132**(5): 1297-1304. 10.1099/00221287-132-5-1297

Van Acker H., Sass A., Dhondt I., Nelis H. J. & Coenye T. (2014). "Involvement of toxin–antitoxin modules in *Burkholderia cenocepacia* biofilm persistence." Pathogens and Disease **71**(3): 326-335. 10.1111/2049-632x.12177

Vandivier R. W., Fadok V. A., Hoffmann P. R., Bratton D. L., Penvari C., Brown K. K., Brain J. D., Accurso F. J. & Henson P. M. (2002). "Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis." J Clin Invest **109**(5): 661-670. 10.1172/jci13572

Vergara-Irigaray M., Valle J., Merino N., Latasa C., Garcia B., Ruiz de Los Mozos I., Solano C., Toledo-Arana A., Penades J. R. & Lasa I. (2009). "Relevant role of

fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections." Infect Immun **77**(9): 3978-3991. 10.1128/iai.00616-09

Verma A., Kumar P., Babb K., Timoney J. F. & Stevenson B. (2010). "Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins." PLoS Negl Trop Dis **4**(8): e778. 10.1371/journal.pntd.0000778

Verma A., Rathinam S. R., Priya C. G., Muthukkaruppan V. R., Stevenson B. & Timoney J. F. (2008). "LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis." Clin Vaccine Immunol **15**(6): 1019-1023. 10.1128/cvi.00203-07

Verma A., Stevenson B. & Adler B. (2013). "Leptospirosis in horses." Vet Microbiol **167**(1-2): 61-66. 10.1016/j.vetmic.2013.04.012

Vieira M. L., Alvarez-Flores M. P., Kirchgatter K., Romero E. C., Alves I. J., de Moraes Z. M., Vasconcellos S. A., Chudzinski-Tavassi A. M. & Nascimento A. L. T. O. (2013). "Interaction of *Leptospira interrogans* with human proteolytic systems enhances dissemination through endothelial cells and protease levels." Infection and Immunity **81**(5): 1764-1774. 10.1128/iai.00020-13

Vieira M. L., de Moraes Z. M., Vasconcellos S. A., Romero E. C. & Nascimento A. L. T. O. (2011). "In vitro evidence for immune evasion activity by human plasmin associated to pathogenic *Leptospira interrogans*." Microbial pathogenesis **51**(5): 360-365. 10.1016/j.micpath.2011.06.008

Vieira M. L., Fernandes L. G., Domingos R. F., Oliveira R., Siqueira G. H., Souza N. M., Teixeira A. R., Atzingen M. V. & Nascimento A. L. (2014). "Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions." FEMS Microbiology Letters **352**(2): 129-139.

Vinod Kumar K., Lall C., Vimal Raj R., Vedhagiri K., Sunish I. P. & Vijayachari P. (2016). "In Vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Leptospira* Biofilm." Microb Drug Resist **22**(7): 511-514. 10.1089/mdr.2015.0284

Vinod Kumar K., Lall C., Vimal Raj R., Vedhagiri K. & Vijayachari P. (2016). "Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms." Lett Appl Microbiol **62**(4): 311-315. 10.1111/lam.12533

Vrany J. D., Stewart P. S. & Suci P. A. (1997). "Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics." Antimicrob Agents Chemother **41**(6): 1352-1358. 10.1128/aac.41.6.1352

Vuong C., Voyich J. M., Fischer E. R., Braughton K. R., Whitney A. R., DeLeo F. R. & Otto M. (2004). "Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system." Cell Microbiol **6**(3): 269-275. 10.1046/j.1462-5822.2004.00367.x

Waack U. & Nicholson T. L. (2018). "Subinhibitory Concentrations of Amoxicillin, Lincomycin, and Oxytetracycline Commonly Used to Treat Swine Increase *Streptococcus suis* Biofilm Formation." Frontiers in Microbiology **9**(2707). 10.3389/fmicb.2018.02707

Waldner J. S. (2017). "Untersuchungen zum Vorkommen von Serum Amyloid A im Pferdeauge." Dissertation, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Waldner J. S., Gerhards H. & Wollanke B. (2018). "Untersuchungen über das Auftreten von Serum-Amyloid A im Auge des Pferdes." Pferdeheilkunde **34**(5): 461-467.

Walker T. S., Tomlin K. L., Worthen G. S., Poch K. R., Lieber J. G., Saavedra M. T., Fessler M. B., Malcolm K. C., Vasil M. L. & Nick J. A. (2005). "Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils." Infect Immun **73**(6): 3693-3701. 10.1128/iai.73.6.3693-3701.2005

Wang X., Preston J. F., 3rd & Romeo T. (2004). "The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for

biofilm formation." J Bacteriol **186**(9): 2724-2734. 10.1128/jb.186.9.2724-2734.2004

Waters V. & Ratjen F. (2015). "Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev(3): Cd009528. 10.1002/14651858.CD009528.pub3

Werry H. & Gerhards H. (1992). "Zur operativen Therapie der equinen rezidivierenden Uveitis." Tierarztl Prax **20**(2): 178-186.

Westgate S. J., Percival S. L., Knottenbelt D. C., Clegg P. D. & Cochrane C. A. (2011). "Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms." Vet Microbiol **150**(1-2): 152-159. 10.1016/j.vetmic.2011.01.003

Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C. & Mattick J. S. (2002). "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." Science **295**(5559): 1487. 10.1126/science.295.5559.1487

Williams R. D., Morter R. L., Freeman M. J. & Lavignette A. M. (1971). "Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis." Invest Ophthalmol **10**(12): 948-954.

Wissdorf H., Otto B. & Gerhards H. (2002). Augapfel und Sehnerv. Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes, Wissdorf H., Gerhards H., Huskamp B., Deegen E. (Hrsg.). **2**: 112-142.

Wolcott R., Costerton J. W., Raoult D. & Cutler S. J. (2013). "The polymicrobial nature of biofilm infection." Clin Microbiol Infect **19**(2): 107-112. 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x

Wolcott R. D., Rhoads D. D. & Dowd S. E. (2008). "Biofilms and chronic wound inflammation." J Wound Care **17**(8): 333-341. 10.12968/jowc.2008.17.8.30796

Wolcott R. D., Rumbaugh K. P., James G., Schultz G., Phillips P., Yang Q., Watters C., Stewart P. S. & Dowd S. E. (2010). "Biofilm maturity studies indicate sharp

debridement opens a time- dependent therapeutic window." J Wound Care **19**(8): 320-328. 10.12968/jowc.2010.19.8.77709

Wollanke B. (2002). "Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) als intraokulare Leptospirose." Habilitationsschrift, LMU München. Tierärztl. Fakultät.

Wollanke B. (2020). Persönliche Mitteilung.

Wollanke B., Gerhards H., Brem S., Meyer P. & Kopp H. (2004). "Ätiologie der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU): Autoimmunkrankheit oder intraokulare Leptospiroseinfektion?" Pferdeheilkunde **20**: 327-340. 10.21836/PEM20040403

Wollanke B., Rohrbach B. W. & Gerhards H. (2001). "Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis." Journal of the American Veterinary Medical Association **219**(6): 795-800. 10.2460/javma.2001.219.795

Woods E. J., Davis P., Barnett J. & Percival S. L. (2010). "10 Wound Healing Immunology and Biofilms." Microbiology of wounds: 271.

Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K. C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J. R., Randell S., Boucher R. C. & Döring G. (2002). "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients." J Clin Invest **109**(3): 317-325. 10.1172/jci13870

Wozniak D. J., Wyckoff T. J., Starkey M., Keyser R., Azadi P., O'Toole G. A. & Parsek M. R. (2003). "Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7907-7912. 10.1073/pnas.1231792100

Yager D. R. & Nwomeh B. C. (1999). "The proteolytic environment of chronic wounds." Wound Repair Regen **7**(6): 433-441. 10.1046/j.1524-475x.1999.00433.x

Yamaguchi T., Higa N., Okura N., Matsumoto A., Hermawan I., Yamashiro T., Suzuki T. & Toma C. (2018). "Characterizing interactions of *Leptospira interrogans*

with proximal renal tubule epithelial cells." BMC Microbiology **18**(1): 64. 10.1186/s12866-018-1206-8

Yang J. J., Kettritz R., Falk R. J., Jennette J. C. & Gaido M. L. (1996). "Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase." Am J Pathol **149**(5): 1617-1626.

Yipp B. G. & Kubes P. (2013). "NETosis: how vital is it?" Blood **122**(16): 2784-2794. 10.1182/blood-2013-04-457671

Zachary I. G. & Forster R. K. (1976). "Experimental intravitreal gentamicin." Am J Ophthalmol **82**(4): 604-611. 10.1016/0002-9394(76)90549-3

Zheng Z. (2004). "Growth limitation of Staphylococcus epidermidis in biofilms contributes to rifampin tolerance." Biofilms **1**: 31-35. 10.1017/S1479050503001042

Zheng Z. & Stewart P. S. (2002). "Penetration of rifampin through Staphylococcus epidermidis biofilms." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 900-903. 10.1128/aac.46.3.900-903.2002

Zhou R. & Caspi R. R. (2010). "Ocular immune privilege." F1000 Biol Rep **2**. 10.3410/b2-3

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schritte der Biofilm-Bildung	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biofilm-Bildung von Staphylokokken, mediert durch CWA-Proteine	14
Abbildung 3: eDNA-vermittelte Anhaftung an eine Oberfläche	17
Abbildung 4: Schädigung des umliegenden Gewebes durch ineffektive Immunabwehr	30
Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von <i>L.-interrogans</i> - Biofilm auf einer Glasoberfläche	56
Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Biofilm auf der Oberfläche eines Reisblatts	57
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Darstellung des Glaskörpergerüsts eines gesunden Pferdeauges	66
Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus Glaskörperproben	68
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Phagozyten mit intrazellulärer Leptospire	69
Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren aus an ERU erkrankten Augen	82
Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Darstellung von Kultur-Leptospiren ..	83
Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von ERU- Glaskörperproben	83
Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Leptospiren- Biofilm	84

IX. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Empfindlichkeit von planktonischen und im Biofilm befindlichen

Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika35

X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
Aap	<i>Accumulation associated protein</i>
ADEP	Acyldepsipeptid
AHL	Acyliertes Homoserin-Lakton
Bap	<i>Biofilm-associated protein</i>
bzw.	beziehungsweise
CdrA	<i>Cyclic diguanylate-regulated two-partner secretion partner A</i>
CdrB	<i>Cyclic diguanylate-regulated two-partner secretion partner B</i>
CWA	<i>cell wall anchored</i>
CsA	Cyclosporin A
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	extrazelluläre DNA
ESI-MS	<i>Electron Spray Ionization Mass Spectrometry</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
ERU	Equine Rezidivierende Uveitis
EZM	Extrazelluläre Matrix
FcBP	<i>Fc-binding protein</i>
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FnBP	<i>Fibronectin binding protein</i>
SdrC	<i>Serine-aspartate repeat-containing protein C</i>
ClfB	<i>Clumping factor B</i>
HGT	<i>Horizontal Gene Transfer</i>
HQNO	2-n-Heptyl-4-Hydroxyquinolon-N-Oxid
IFN-γ	Interferon-gamma
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IRBP	<i>Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
<i>L. biflexa</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LFU	<i>low-frequency ultrasound</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LruA	<i>Leptospiral recurrent uveitis associated protein A</i>
LruB	<i>Leptospiral recurrent uveitis associated protein B</i>
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
mg	Milligramm
MAR	Mikroagglutinationsreaktion

MBC	<i>minimum bactericidal concentration</i>
MDK	<i>Minimal Duration for Killing</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
MMC	Mitomycin C
ml	Milliliter
MSCRAMM	<i>Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule</i>
NEAT	<i>near iron transporter</i>
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
PDE	Phosphodiesterasen
PIA	<i>Polysaccharide intercellular adhesin</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear leucocyte</i>
PNAG	Poly-N-Acetylglucosamin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal
QS	<i>Quorum Sensing</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SAA	Serum-Amyloid A
SasG-Protein	<i>S. aureus surface protein G</i>
SCVs	<i>Small Colony Variants</i>
SraP	<i>serine-rich adhesin for platelets</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloprotease</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel

XI. DANKSAGUNG

Ich möchte mich sehr herzlich bei meiner Doktormutter PD Dr. Bettina Wollanke für die Überlassung dieses spannenden Themas bedanken. Vielen Dank für die vielen beantworteten Fragen, die stets gewährte Unterstützung und besonders für die schnelle Durchsicht des Manuskripts und konstruktive Rückmeldung vor Abgabe der Arbeit.

Ich danke sehr meinen Kolleginnen Dr. Jessica Waldner und Dr. Vanessa Franzen, die mir in den Wochen vor Abgabe den Rücken freigehalten haben und Dr. Kirsten Hahn für den stets positiven Zuspruch während der Promotionszeit.

Vielen Dank an meine Schwester Svenja Geißler für die vielen konstruktiven Vorschläge beim Korrekturlesen, die immerwährende Unterstützung und den großen Erfahrungsschatz bei Fragen rund um das wissenschaftliche Schreiben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Leonard Glück bedanken – für die vielen gemeinsamen (Doktor-) Arbeitsstunden, die seelische und moralische Unterstützung in den Wochen vor Abgabe, die große Hilfsbereitschaft und die vielen Lösungsansätze auf meine Fragen. Danke für die immerschöne Zeit mit Dir!

Vielen lieben Dank an meine Eltern, die mir eine sorgenfreie Studien- und Promotionszeit ermöglicht haben. Vielen Dank, dass ich mich immer auf Eure Unterstützung verlassen kann.